

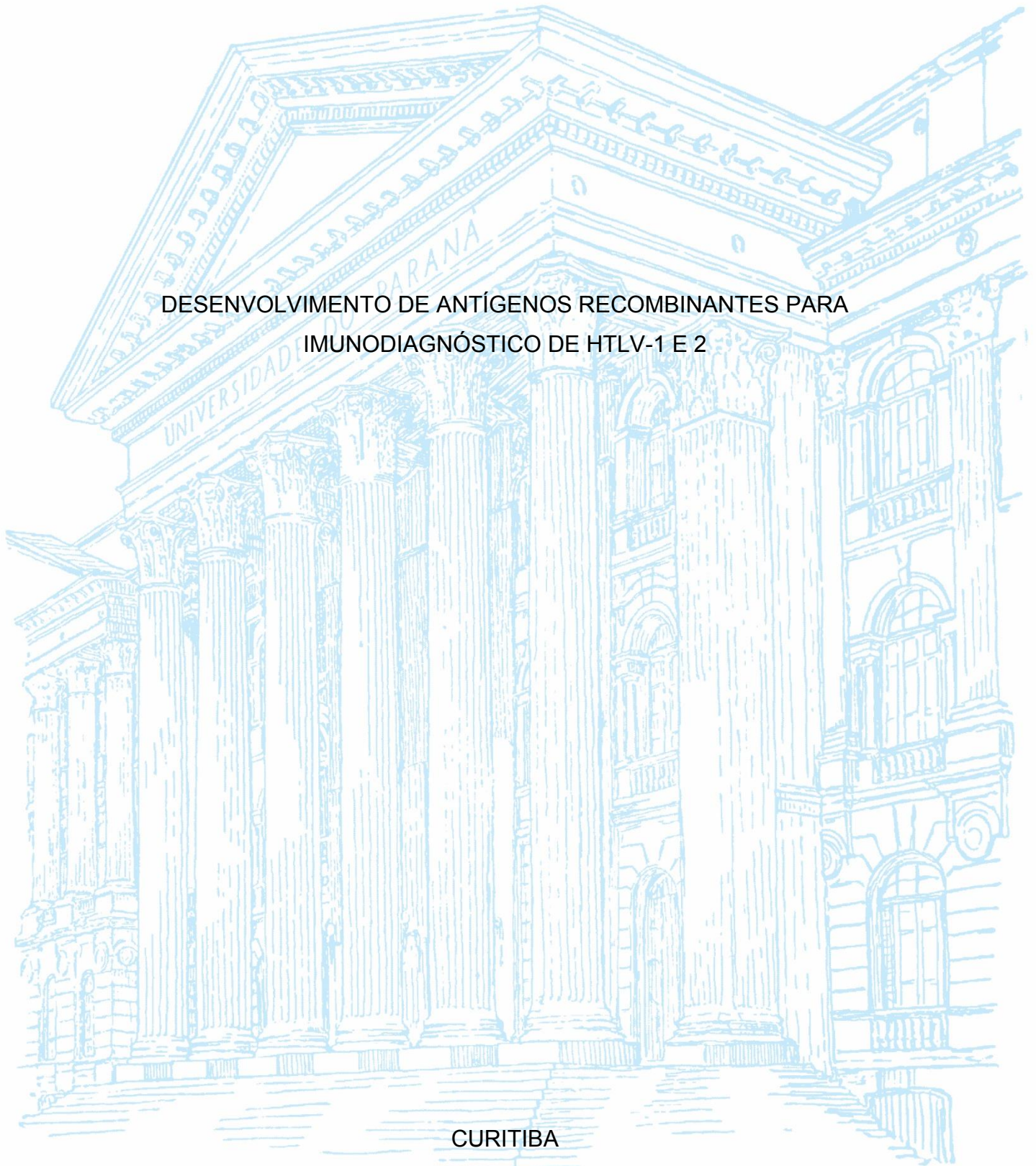
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

UERITON DIAS DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA
IMUNODIAGNÓSTICO DE HTLV-1 E 2

CURITIBA

2019



UERITON DIAS DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA
IMUNODIAGNÓSTICO DE HTLV-1 E 2

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin

Coorientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Krieger

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Oliveira, Ueriton Dias de.
Desenvolvimento de antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de
HTLV-1 e 2. / Ueriton Dias de Oliveira. – Curitiba, 2019.
125 f. : il.

Orientador: Nilson Ivo Tonin Zanchin
Coorientador: Marco Aurélio Krieger
Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Antígenos. 2. HTLV-I (Vírus). 3. Imunodiagnóstico. 4. Infecções por
HTLV-II. I. Título. II. Zanchin, Nilson Ivo Tonin. III. Krieger, Marco Aurélio. IV.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 576.64



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **UERITON DIAS DE OLIVEIRA** intitulada: **Desenvolvimento de antígenos recombinantes para Imunodiagnóstico de HTLV-1 e 2**, sob orientação do Prof. Dr. NILSON IVO TONIN ZANCHIN, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Outubro de 2019.

NILSON IVO TONIN ZANCHIN
Presidente da Banca Examinadora

DANIELA PARADA PAVONI
Avaliador Interno

ADRIANA FROHLICH MERCADANTE
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

LUÍZA HELENA GREMSKI
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

DAISY MARIA STROTTMANN
Avaliador Externo (ICC-FIOCRUZ)



**Em memória de meus pais que nunca mediram
esforços para que eu realizasse meus sonhos.**

Minha eterna saudade e gratidão!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin, por me aceitar como aluno e pela paciência e dedicação em me ensinar e estimular meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Marco Aurélio Krieger meu co-orientador, por me acolher na equipe de desenvolvimento de antígenos e me apresentar ao meu orientador.

À Dra. Paola Alejandra Fiorani Celedon, por todo aprendizado, inúmeras contribuições, por dividir seu conhecimento com muito carinho e profissionalismo, por me acolher e me incentivar desde minha entrada na pós-graduação.

À minha querida amiga Dra. Adriana Ludwig que sempre me incentivou, sempre prestativa e todo tempo que dedicou contribuindo com este trabalho.

Ao Dr. Fred Luciano Neves Santos pelas inúmeras contribuições, pelo fornecimento de amostras sorológicas e auxílio nas análises dos ensaios imunológicos.

Aos alunos e pesquisadores do Laboratório Biologia Estrutural e Engenharia de Proteínas: Arthur, Amanda, Maikel, Giovana, Lidia, Lucca, Bruno, Ana Carolina e Heloisa e pela constante cooperação e apoio. Em especial a Dra. Beatriz Guimaraes pelas valorosas contribuições.

À Dra. Tatiana Assunção pela amizade, profissionalismo e disposição em colaborar nos experimentos realizados na Plataforma de Purificação e Caracterização de Proteínas.

Aos colegas da equipe de desenvolvimento tecnológico do Instituto de Biologia Molecular do Paraná, em especial a Dra. Sandra Crestani pelas boas conversas e disposição em ajudar.

Ao departamento de Biologia celular e molecular da UFPR que permitiu a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Biologia Molecular do Paraná e Instituto Carlos Chagas pelo apoio e estrutura fornecidos para realização deste trabalho, em especial ao Dr. Fabrício Marchini pela confiança e pelo investimento realizado em minha formação.

“Tudo bem não saber todas as respostas. É melhor admitir ignorância do que acreditar em verdades que são falsas. Fingir saber de tudo fecha as portas para que enxerguemos a realidade da forma como ela é.”

Neil deGrasse Tyson

RESUMO

O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia / linfoma de células T do adulto e paraparesia espástica tropical, também conhecida como mielopatia associada ao HTLV. A associação de infecções por HTLV-2 com doenças neoplásicas ainda não foi claramente estabelecida. Ambos são retrovírus com um genoma de RNA compreendendo os seguintes genes: gag que codifica as proteínas da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo; env, codificando as proteínas do envelope viral; pol, codificando a transcriptase reversa e; o gene pX que codifica proteínas reguladoras. A resposta inicial dos anticorpos à infecção pelo HTLV é direcionada às proteínas estruturais codificadas pelos genes gag e env. A maioria dos testes de diagnóstico é baseada na detecção de anticorpos que reconhecem essas proteínas. Não existe tratamento de cura completa ou vacina neutralizadora para infecções por HTLV. Portanto, o diagnóstico precoce é de extrema importância para o controle epidemiológico em regiões endêmicas e para o tratamento de indivíduos infectados. No Brasil, há uma necessidade de incentivo para a produção local de ensaios de diagnóstico, como os testes de diagnóstico utilizados para monitorar sangue para transfusão e redes de atenção primária à saúde. Esses testes geralmente são importados, o que aumenta os custos de triagem e diagnóstico confirmatório para esta infecção. Neste trabalho, as sequências completas ou regiões imunogênicas das proteínas p19, p24, gp21, gp46 do HTLV-1 e 2 foram clonadas nos vetores de expressão de *Escherichia coli* e expressas com sucesso como proteínas únicas ou quiméricas. Um total de nove antígenos HTLV-1 e cinco HTLV-2 foram produzidos compreendendo diferentes regiões imunogênicas desses vírus. Entre esses antígenos, apenas as construções antigênicas HTLV-1 Ag 2-4, Ag 2-12, Ag 2-13 e Ag 2-16 e o HTLV-2 Ag 3-3 e Ag 3-4 foram expressos na fração solúvel. Os antígenos restantes foram solubilizados a partir de corpos de inclusão usando ureia. Todos os antígenos purificados foram avaliados em ensaios por ELISA com amostras de soro positivas para HTLV em paralelo com um conjunto de amostras de controle negativo. Três antígenos do HTLV-1 atingiram índices de sensibilidade e especificidade de 98% ou mais. Um antígeno HTLV-2 mostrou um valor de sensibilidade de 100% e especificidade de 95,7%. As amostras de soro, no entanto, não foram genotipadas, de modo que não foi possível avaliar a correlação entre a eficiência do antígeno e o tipo de HTLV. No entanto, estes dados mostraram que esses dois vírus dificilmente podem ser diferenciados com base em imunoenaios. Poucos antígenos recombinantes do HTLV-1 mostraram reação cruzada com soros HIV positivos, enquanto o HTLV-2 mostrou uma extensão significativa da reação cruzada com soros HIV. Em conclusão, a eficiência demonstrada por esses antígenos demonstra seu potencial de utilização em ensaios para triagem de sangue para transfusão e para rede de atenção primária à saúde.

Palavras-chave: antígenos recombinantes; HTLV1/2; imunodiagnóstico

ABSTRACT

HTLV-1 is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma and tropical spastic paraparesis, also known as HTLV-associated myelopathy. Association of HTLV-2 infections with neoplastic diseases have not been clearly established yet. Both are retroviruses with an RNA genome comprising the following genes: *gag* that encodes the matrix, capsid, and nucleocapsid proteins; *env*, encoding the viral envelope proteins; *pol*, encoding the reverse transcriptase and; the *pX* gene encoding regulatory proteins. The initial antibody response upon HTLV infection is directed towards the structural proteins encoded by the *gag* and *env* genes. Most diagnosis tests are based on the detection of antibodies that recognize these proteins. There is no complete cure treatment or neutralizing vaccine for HTLV infections. Therefore, early diagnosis is of extreme importance for epidemiological control in endemic regions and for treatment of infected individuals. In Brazil, there is a need and incentive for local production of diagnostic assays, such as the diagnostic tests used to monitor blood for transfusion and primary health care networks. These tests are usually imported, which adds up to the costs for screening and confirmatory diagnosis for this infection. In this work, the complete sequences or immunogenic regions of HTLV-1 and 2 proteins p19, p24, gp21, gp46 were cloned into *Escherichia coli* expression vectors and successfully expressed as single or chimeric proteins. A total of nine HTLV-1 and five HTLV-2 antigens were produced comprising different immunogenic regions of these viruses. Among these antigens, only the HTLV-1 Ag2-4, Ag2-12, Ag2-13 and Ag2-16 antigenic constructs and the HTLV-2 Ag3-3 and Ag3-4 were expressed in soluble fraction. The remaining antigens were solubilized from inclusions bodies using urea. All purified antigens were evaluated in ELISA assays with HTLV-positive serum samples in parallel with a set of control samples. Three HTLV-1 antigens reached sensibility and specificity indexes of 98% or higher. An HTLV-2 antigen showed a sensibility value of 100% and specificity of 95,7%. The serum samples, however, have not been genotyped so that a correlation between antigen efficiency and HTLV type could not be evaluated. However, these data shown that these two viruses can hardly be differentiated based on immunoassays. The HTLV-1 antigens showed no cross reaction with HIV positive sera whereas the HTLV-2 showed a significant extent of cross reaction with HIV sera. In conclusion, the efficiency shown by these antigens demonstrates their potential for utilization in assays to screen blood for transfusion and for primary health care network.

Keywords: recombinant antigens; HTLV1 / 2; immunodiagnosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA E GENOMA DO VÍRUS HTLV	22
FIGURA 2: ESQUEMA DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS HTLV	24
FIGURA 3: PREVALÊNCIA DE HTLV-1 NO MUNDO	28
FIGURA 4: PREVALÊNCIA DE HTLV-1 EM DOADORES DE SANGUE NAS 26 CAPITAIS BRASILEIRAS E DISTRITO FEDERAL	29
FIGURA 5: PREVALÊNCIA DE HTLV-2 NO MUNDO	31
FIGURA 6: ESQUEMA DAS CONSTRUÇÕES ANTIGÊNICAS DESENVOLVIDAS	56
FIGURA 7: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-2	57
FIGURA 8: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-4	57
FIGURA 9: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-5	58
FIGURA 10: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-7	58
FIGURA 11: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-12	59
FIGURA 12: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-13	59
FIGURA 13: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-14	60
FIGURA 14: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-15	60
FIGURA 15: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-16	61
FIGURA 16: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-1	61
FIGURA 17: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-3	62
FIGURA 18: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-4	62
FIGURA 19: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-5	63
FIGURA 20: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-7	63
FIGURA 21: ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA SOLUBILIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS AG 2-2 E AG 3-1	64
FIGURA 22: ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE ENVELOPE VIRAL AG 2-2 DE HTLV-1 E AG 3-1 DE HTLV-2 EM RESINA DE NÍQUEL	65
FIGURA 23: ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-4 (P24 DE HTLV-1)	66
FIGURA 24: AVALIAÇÃO DE SOLUBILIDADE EM RELAÇÃO A TEMPERATURA DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO AG 2-5	67
FIGURA 25: ANÁLISE DO ENSAIO DE SOLUBILIZAÇÃO POR DESNATURAÇÃO DO ANTÍGENO AG 2-5	68
FIGURA 26: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-5	69
FIGURA 27: AVALIAÇÃO DE SOLUBILIDADE EM RELAÇÃO A TEMPERATURA DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO AG 2-7	70
FIGURA 28: ANÁLISE DO ENSAIO DE SOLUBILIZAÇÃO POR DESNATURAÇÃO DO ANTÍGENO AG 2-7	71
FIGURA 29: AVALIAÇÃO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-12	72
FIGURA 30: AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-13	73
FIGURA 31: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO AG 2-14	74
FIGURA 32: AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-15	75
FIGURA 33: AVALIAÇÃO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL DO ANTÍGENO AG 2-16	76
FIGURA 34: ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 3-3	77
FIGURA 35: AVALIAÇÃO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 3-4	78
FIGURA 36: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 3-5	79
FIGURA 37: SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO AG 3-7	81
FIGURA 38: GEL DE POLIACRILAMIDA DOS ANTÍGENOS DE HTLV-1 E 2	82
FIGURA 39: PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	83
FIGURA 40: AVALIAÇÃO DA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS POR ELISA	86

FIGURA 41: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS POR ELISA COM OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-1	89
FIGURA 42: RESULTADO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS POR ELISA COM OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-2	92
FIGURA 43: ANÁLISE DO ÍNDICE DE REATIVIDADE NOS ENSAIOS COMBINADOS DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-1	94
FIGURA 44: ANÁLISE DO ÍNDICE DE REATIVIDADE NOS ENSAIOS COMBINADOS DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-2	96
FIGURA 45: ANÁLISE GRÁFICA DO ÍNDICE DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS DE HTLV-1 E 2 COM AMOSTRAS SÉRICAS POSITIVAS PARA HIV	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: EPÍTOPOS LINEARES IDENTIFICADOS POR (HORAL ET AL., 1991)	32
TABELA 2: SEQUÊNCIA GENICA DOS CLONES	41
TABELA 3: DESCRIÇÃO DOS CLONES CONSTRUÍDOS.....	44
TABELA 4: GRAU DE VARIABILIDADE DE MÚLTIPLAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ENTRE PROTEÍNAS DE HTLV-1	54
TABELA 5: GRAU DE VARIABILIDADE DE MÚLTIPLAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ENTRE PROTEÍNAS DE HTLV-2	55
TABELA 6: CONSERVAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS DIFERENTES PROTEÍNAS DO HTLV ENTRE OS TIPOS HTLV-1 E HTLV-2.....	55
TABELA 7: RESUMO DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE HTLV-1 E 2	84
TABELA 8: PARÂMETROS DE DESEMPENHO DOS ANTÍGENOS DE HTLV-1	90
TABELA 9: PARÂMETROS DE DESEMPENHO DOS ANTÍGENOS DE HTLV-2.	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
6xHis	Sequência de seis moléculas do aminoácido histidina
A600	Absorbância a 600 nm
aa	Aminoácidos
AEQ	Agente Externo de Qualidade
Ag	Antígeno
Anti-His	Anticorpo contra a etiqueta polihistidina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATL	Leucemia de células T em adultos
<i>Bam</i> HI	Enzima de restrição do tipo II isolada de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BL21-Star (DE3)	Linhagem de <i>E. coli</i> usada para expressão de proteínas recombinantes
bp	base pairs (pares de base)
BSA	Bovine serum albumin
C	Carboxi
CAPS	3-(Cyclohexylamino) -1-PropaneSulfonic Acid
C-terminal	Carboxi-terminal
CV	Column volume (volumes de coluna)
D.O	Densidade Óptica
DH5α	Linhagem de <i>E. coli</i> usada para clonagem e propagação de plasmídeos
DST	Doença sexualmente transmissível
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco</i> RI	Enzima de restrição isolada de <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
EIA	Ensaio imunoenzimático

ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
G	Grama
H	hora
HCl	Cloreto de hidrogênio
<i>HindIII</i>	Enzima de restrição do tipo III isolada de <i>Haemophilus influenzae</i>
HP	High Performance
HTLV	Human T lymphotropic virus (vírus T-linfotrópico humano).
IF	Imunofluorescência
IFA	Teste de imunofluorescência
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IMAC	Immobilized Metal Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Mil Daltons
L	Litro
LACEN	Laboratório Central do Estado
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (BioManguinhos-Rio de Janeiro-RJ)
LB	Luria-Bertani
LLT	Leucemia de linfócitos T
LTR	Regiões longas repetidas
mA	Miliamperagem
MES	2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mpa	Mega Pascal
N	Amino
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma

Ni-NTA	Níquel-Nitrilotriacetic Acid
Nm	Nanômetro
N-terminal	Amino-terminal
ORFs	Open reading frames
p/v	Peso/volume
PBS	Tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBS-T	Phosphate Buffered Saline-Tween-20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
PET/MAH	Paraparesia espástica tropical, mielopatia associada ao HTLV-1
pET28a	Tipo de plasmídeo usado para expressão de proteínas em <i>E. coli</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Potencial iônico
PMSF	<i>Phenyl methane sulphonyl fluoride</i>
Psi	Pound force per square inch (pressão: libra força por polegada quadrada)
pUC57	Vetor de clonagem de plasmídeo em <i>E. coli</i>
RDC	Resolução da diretoria colegiada.
ROC	Receiver Operator Characteristic
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfado de sódio
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TCB	Tampão carbonato-bicarbonato
TM	Transmembrana
Tris	Tri (hydroxymethyl) amino methane
V	Volts
WB	<i>Western Blotting</i>
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
x g (RCF)	Força centrífuga relativa
µg	Micrograma
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Os vírus do grupo HTLV	21
2.2	Importância clínica das infecções pelo HTLV - 1 e 2.....	24
2.3	Formas de transmissão dos vírus do grupo HTLV.....	26
2.4	Prevalência de infecção pelos vírus do grupo HTLV	28
2.5	Proteínas antigênicas determinantes no imunodiagnóstico de HTLV-1 e 2.....	31
2.6	Diagnóstico laboratorial	34
2.7	Expressão de proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	35
2.8	Demanda de testes sorológicos.....	36
3.	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo Geral.....	39
3.2	Objetivos específicos	39
4.	METODOLOGIA	40
4.1	Avaliação da divergência genética entre os antígenos dos subtipos de HTLV	40
4.2	Obtenção das sequências gênicas	40
4.3	Subclonagem dos genes sintéticos em vetor de expressão	44
4.4	Transformação de bactérias <i>E. coli</i> BL21 - Star (DE3) por choque térmico.....	45
4.5	Construções quiméricas: proteína de capsídeo fusionadas a proteínas de envelope 45	
4.6	Sistema de expressão para os antígenos recombinantes.....	46
4.7	Expressão das proteínas recombinantes	46
4.7.1	Crescimento do inóculo	46
4.8	Extração das proteínas recombinantes	47
4.8.1	Preparação dos extratos por sonicação.....	47
4.8.2	Extração de proteínas recombinantes por lise mecânica.....	48
4.9	Solubilização das proteínas expressas em forma de corpos de inclusão	48
4.10	Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	49
4.11	Purificação das proteínas recombinantes	50
4.12	Ensaio imunológico por ELISA	51
4.12.1	Padronização dos ensaios por ELISA.....	51
4.12.2	Amostras sorológicas.....	52
4.12.3	Análise de dados.....	53
5.	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	54

5.1	Análise da variabilidade genética	54
5.2	Definição das construções genéticas para expressão dos antígenos de HTLV-1 e 2	55
5.3	Sequências de aminoácidos dos clones usados para expressão dos antígenos de HTLV-1	56
5.4	Sequências de aminoácidos dos antígenos de HTLV-2.....	61
5.5	Expressão e solubilização dos antígenos baseados nas proteínas de envelope Ag 2-2 de HTLV-1 e Ag 3-1 de HTLV-2	64
5.6	Purificação dos antígenos de envelope Ag 2-2 de HTLV-1 e Ag 3-1 de HTLV-2.....	65
5.7	Análise da purificação por afinidade do antígeno Ag 2-4 de HTLV-1	65
5.8	Expressão, solubilização e purificação do antígeno Ag 2-5	66
5.8.1	Teste de expressão: Avaliação de solubilidade do antígeno Ag 2-5.....	67
5.8.2	Ensaio de solubilização do antígeno Ag 2-5.....	67
5.8.3	Purificação por afinidade em resina de níquel do antígeno Ag 2-5	68
5.9	Expressão, solubilização e purificação do antígeno Ag 2-7 (p24 + gp46 de HTLV-1)	69
5.9.1	Teste de expressão: Avaliação de solubilidade do antígeno Ag 2-7.....	69
5.9.2	Ensaio de solubilização do antígeno Ag 2-7.....	70
5.10	Purificação por afinidade do antígeno Ag 2-12	71
5.11	Purificação por afinidade em resina de níquel do antígeno Ag 2-13	72
5.12	Solubilização e purificação do antígeno Ag 2-14.....	73
5.13	Purificação por afinidade do antígeno Ag 2-15	74
5.14	Purificação por afinidade do antígeno Ag 2-16	75
5.15	Análise da purificação por afinidade da proteína de capsídeo p24 de HTLV-2, antígeno Ag 3-3.....	76
5.16	Purificação por afinidade do antígeno AG 3-4.....	77
5.17	Expressão, solubilização e purificação por afinidade do antígeno Ag 3-5.....	78
5.18	Expressão, solubilização e purificação do antígeno Ag 3-7	80
5.19	Conjunto de antígenos obtidos	81
5.20	Padronização de ensaios de ELISA.....	84
5.21	Ensaio imunológico por ELISA antígenos de HTLV-1 e 2	86
5.22	Avaliação do índice de reatividade dos ensaios imunológicos por ELISA realizados com combinação dos antígenos recombinantes de HTLV-1	93
5.23	Avaliação do índice de reatividade dos ensaios imunológicos por ELISA realizados com combinações equimolares dos antígenos recombinantes de HTLV-2.....	95
5.24	Avaliação de reatividade cruzada com soros de HIV	96
6.	DISCUSSÃO.....	98
6.1	Produção proteínas estruturais de HTLV recombinantes em sistema procarioto ...	98
6.2	Potencial dos antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de HTLV-1 e 2 ...	101

6.3	Desempenhos dos ensaios imunológicos com misturas de antígenos.....	102
6.4	Amostras da zona cinza	103
6.5	Reatividade cruzada com soros de portadores de HIV.....	103
6.6	Ensaio imunológico por ELISA	104
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
8.	REFERÊNCIAS	109

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecto-parasitárias figuram como a terceira maior causa de desenvolvimento de câncer no mundo. Vários agentes infecciosos e parasitários foram descritos associados ao desenvolvimento de câncer entre estes os retrovírus HTLV-1 e HTLV-2 De Flora; La Maestra (2015).

Embora os vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-1 e 2), tenham sido descritos há mais de 30 anos e mesmo o HTLV-1 estando associado a doenças graves, eles são relativamente desconhecidos do público e até mesmo aos profissionais de saúde. Estas manifestações ocorrem em apenas cerca de 10% dos indivíduos infectados, o que poderia explicar a falta de conhecimento público sobre o vírus Carneiro-Proietti et al. (2014).

O vírus HTLV-1 foi inicialmente descoberto em 1979 em pacientes com leucemia de células T, Poiesz et al. (1980 e Seiki et al. (1983). Mais tarde em 1984 no Japão foi isolado o vírus HTLV-2 Yoshida et al. (1984). Esta foi a primeira evidência da relação do vírus HTLV com neoplasias malignas Tagaya; Gallo (2017 e Willems et al. (2016)

Estima-se que entre 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas com HTLV-1 em todo o mundo Fox et al. (2016 e Tsukasaki; Tobinai (2014). No Brasil, a prevalência é de cerca de 800 mil infectados pelo vírus HTLV-1 Gessain; Cassar (2012). Aqui, os primeiros casos relatados ocorreram em imigrantes japoneses no estado do Mato Grosso do Sul Kitagawa et al. (1986). O vírus HTLV-1 é encontrado em todos os estados brasileiros, com maior incidência nas regiões norte e nordeste e menos frequente na região sul. Castro Filho et al. (2009 e Santos (2013). Não existe cura nem vacina neutralizante para a infecção crônica por HTLV-1. O fator determinante do desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1 ainda não é bem esclarecido Lim; Maini (2014). Embora uma pequena parcela das pessoas infectadas com o vírus HTLV-1 desenvolva doenças associadas ao longo da vida, o diagnóstico errôneo de portadores assintomáticos leva ao diagnóstico clínico tardio De Mendoza et al. (2019).

As vias de transmissão pelo HTLV podem ser pelo sexo desprotegido, transmissão materno-infantil e contato com sangue e hemoderivados

contaminados Carneiro-Proietti et al. (2014 e Paiva; Casseb (2014 e Ribeiro et al. (2018, 2012).

O vírus HTLV-1 infecta principalmente linfócitos T CD4+ enquanto HTLV-2 infecta linfócitos T CD8+. A infecção pelo vírus ocorre a partir da invasão por partículas virais às células alvo, a transmissão célula a célula é mais frequente e se dá por sinapse viral. O hospedeiro identifica as partículas virais como estranhas e inicia a produção de anticorpos que poderão ser detectados por testes sorológicos Loureiro (2008).

A triagem sorológica para o HTLV-1 e 2 de potenciais doadores de sangue é obrigatória no Brasil desde 1993. Embora esse rastreamento seja obrigatório, o Ministério da Saúde não exige testes confirmatórios realizados pelos hemocentros Catalan-Soares et al. (2005 e Saúde (2013 e SAÚDE (2016).

A triagem sorológica para HTLV-1 é geralmente realizada por meio de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), aglutinação de partículas ou ensaios por quimiluminescência Da Silva Brito et al. (2018). Entretanto, é difícil comparar os resultados obtidos, uma vez que diferentes testes sorológicos e diferentes critérios de interpretação são usados. Entre os estudos disponíveis, os ensaios por ELISA baseados em antígenos recombinantes são os mais sensíveis Andersson et al. (1999 e Thorstensson et al. (2002). Aplicam-se também o uso de polipeptídeos sintéticos, monoméricos ou quiméricos no qual se obtém um alto desempenho na detecção de anticorpos contra o vírus HTLV-1 Bocalandro et al. (2004).

Consideramos que antígenos em forma de proteínas únicas e construções quiméricas possam ser projetados para a detecção de anticorpos contra as proteínas de envelope, matriz e capsídeo simultaneamente. Assim, projetamos construções antigênicas baseadas nos fragmentos imunodominantes das proteínas estruturais dos vírus HTLV-1 e 2, combinando com informações estruturais visando otimizar o rendimento e purificação.

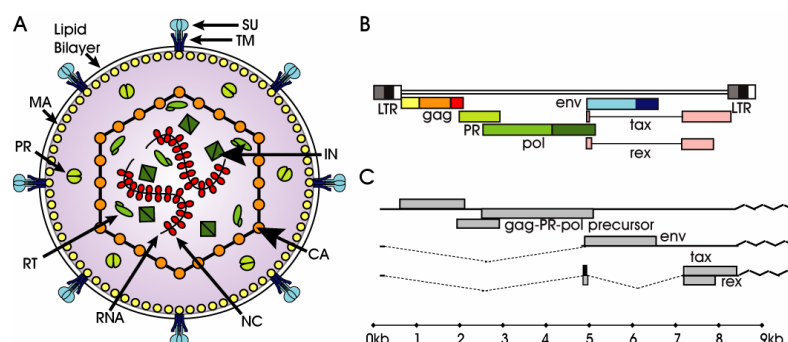
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os vírus do grupo HTLV

Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLVs) são retrovírus humanos complexos do gênero Deltaretrovirus. Quatro tipos foram identificados até agora, sendo o HTLV-1 e HTLV-2 mais prevalentes do que o HTLV-3 e HTLV-4. HTLV-1 e HTLV-2 possuem estruturas genômicas estritamente semelhantes, mas diferem significativamente na patogenicidade. O HTLV do tipo 1 está associado ao desenvolvimento de leucemia de células T de adulto (ATL) e também está relacionado com mielopatia associada ao HTLV-1 também denominada paraparesia espástica tropical (PET/MAH), enquanto que a correlação da infecção pelo HTLV-2 associado a neoplasias não é bem esclarecida Romanelli et al. (2013). Embora o papel do HTLV-2 na doença humana ainda não tenha sido claramente definido, há evidências acumuladas de que, assim como o HTLV-1, a infecção pelo HTLV-2 pode também estar associada a distúrbios linfoproliferativos e neurológicos raros Hall et al. (1996).

Há grande semelhança entre HTLV-1 e HTLV-2 em sua organização genômica e padrão de expressão gênica. Os genomas de HTLV-1 e HTLV-2 podem ser divididos em cinco regiões 5' LTR, *gag*, *pol*, *env*, *pX* e 3' LTR (FIGURA 1), mas eles diferem substancialmente na cinética de expressão das proteínas reguladoras e acessórias, e nas interações com fatores celulares e vias de transdução de sinal Bender et al. (2012 e Cavallari et al. (2013 e Ciminale et al. (2014).

FIGURA 1: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA E GENOMA DO VÍRUS HTLV



Legenda: A) Corte transversal esquemático do HTLV-1, evidenciando sua estrutura e composição. TM: glicoproteína transmembrana; SU: glicoproteína de superfície; MA: Matriz da membrana; RT: Transcriptase reversa; IN: Integrase; PR: Protease; CA: Capsídeo; NC: Nucleocapsídeo. B) Organização genômica do HTLV-1. C) RNAs mensageiros

FONTE: Van Dooren (2005).

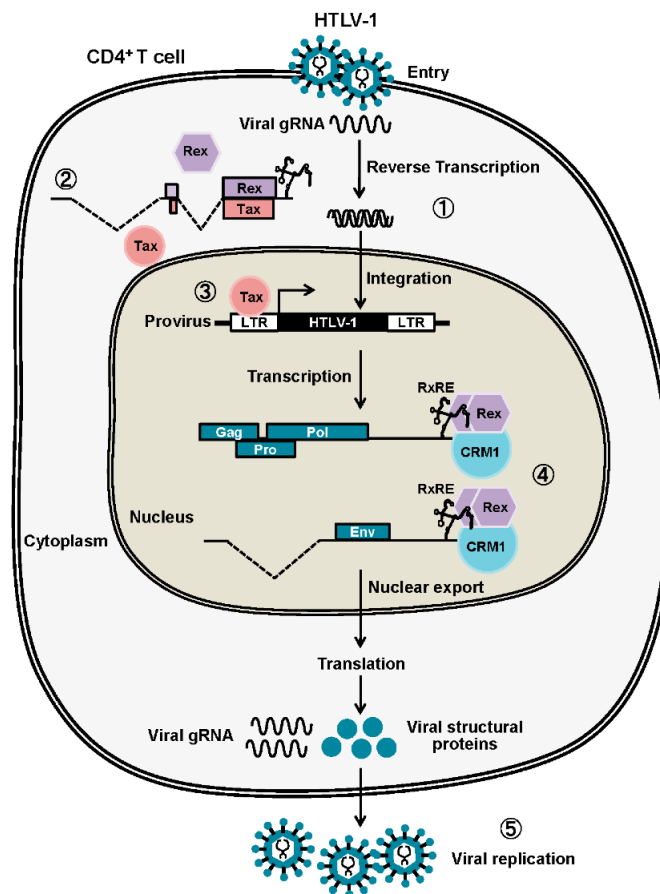
O genoma do vírus HTLV-1 (FIGURA 1B) possui aproximadamente 9 mil pares de bases, sendo semelhante aos demais retrovírus pelas regiões *gag*, *pol* e *env*, mas seu genoma codifica ainda duas proteínas adicionais *tax* e *rex* envolvidas na regulação da expressão gênica. Tax é a proteína transativadora da transcrição do genoma viral na célula hospedeira se ligando à região 5' LTR e *rex* que atua como moduladora do transporte de RNAm viral. O gene *env*, codifica as proteínas externas de envelope a partir da precursora gp61/68 derivando a glicoproteína de membrana gp46 e a proteína transmembrana gp21; o gene *pol* codifica as enzimas transcriptase reversa, RNase, endonuclease e protease; o gene *gag* codifica as proteínas de matriz p19, capsídeo p24 e nucleocapsídeo p15; a região pX codifica as proteínas p8, p12, p13, p27, p30, p40 e HBZ que modulam a expressão de Tax Barreto et al. (2017 e Van Dooren (2005 e Suzuki; Gojobori (1998 e Verdonck et al. (2007).

Os estudos dos últimos anos, revelaram que a expressão de genes retrovirais depende de um promotor bidirecional. Esta avaliação decorre sobre descoberta de genes retrovirais denominados HBZ em HTLV-1 e ASP em HIV-1, sua função e a regulação de sua expressão são interligadas a outras proteínas virais. A proteína Tax está diretamente envolvida na transmissão célula a célula do vírus HTLV, atuando na polimerização do citoesqueleto das células infectadas do hospedeiro que induz à formação de sinapse viral Gross et al. (2016). Destaca-se ainda para a potencial implicação destas proteínas

na manutenção da infecção crônica em indivíduos infectados. O conhecimento destes genes representa um novo caminho para o futuro tratamento de indivíduos infectados pelo HTLV-1 Barbeau; Mesnard (2015 e Loureiro (2008 e Matsuoka; Jeang (2007).

A infecção por HTLV ocorre a partir da invasão por partículas virais às células alvo que são os linfócitos T CD4+, a transmissão célula a célula é mais frequente e se dá por sinapse viral. Após a penetração, o nucleocapsídeo se desfaz liberando a transcriptase reversa que inicia síntese do DNA viral a partir do RNA genômico viral. Pela ação da enzima integrase, o DNA pró-viral é integrado ao genoma da célula hospedeira. Após a integração do vírus ocorre a replicação e transcrição dos genes virais, produzindo RNAs das proteínas Tax e Rex reguladoras da replicação viral. Há ainda a formação de RNA mensageiro que codifica para as proteínas estruturais propiciando a formação de novas partículas virais, que emergem por brotamento (FIGURA 2) Nakano et al. (2016).

FIGURA 2: ESQUEMA DO CICLO DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS HTLV



Legenda: 1) RNA genômico viral reversamente transcrito e integrado ao genoma do hospedeiro; 2) Ativação de expressão da proteína Tax viral; 3) Proteína Tax liga-se a 5' LTR e ativa expressão de Rex; 4) mRNAs virais codificando Gag, Pro, Pol e Env, para o citoplasma; 5) replicação viral ativa

FONTE: Nakano et al. (2016)

As partículas virais que emergem por brotamento são reconhecidas como estranhas pelo hospedeiro que inicia a produção de anticorpos que poderão ser detectados por testes sorológicos.

2.2 Importância clínica das infecções pelo HTLV - 1 e 2

Muitos agentes infecciosos contribuem para o desenvolvimento do câncer. Alguns exemplos incluem o vírus do papiloma humano no câncer cervical, os vírus da hepatite B e C no carcinoma hepatocelular, o vírus do herpes no sarcoma de Kaposi, o vírus de Epstein-Barr no carcinoma da nasofaringe, do vírus linfotrófico da célula T humana (HTLV) em leucemia de

células T e linfoma, *Helicobacter pylori* no câncer gástrico. Esses agentes causam instabilidade genômica no hospedeiro e a maioria deles comprometem o sistema imunológico. Ajiro; Zheng (2014 e De Flora; La Maestra (2015 e Vedham et al. (2015 e Vedham; Verma (2015).

A compreensão da interação entre o vírus HTLV-1 e a resposta do hospedeiro melhorou consideravelmente, mas ainda não há marcadores para o prognóstico e há poucas opções de tratamento Verdonck et al. (2007).

As doenças em decorrência da infecção pelo HTLV-1 dividem-se em 3 categorias: síndromes inflamatórias como a paraparesia espástica tropical também denominada mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH), uveíte, artropatias, síndrome de Sjögren, polimiosite, tireoidite, pneumopatias e alveolite do linfócito T. Doenças neoplásicas como a leucemia de linfócitos T em adultos (LTA ou LLTA), linfoma de célula T cutâneo e as infecções oportunistas como a estrogiloidíase, escrabiose encrustada, dermatite infectiva, tuberculose e hanseníase Araujo (2015 e Cassar; Gessain (2017 e Matsuzaki et al. (1993 e Poiesz et al. (1980 e Verdonck et al. (2007). Já o HTLV-2 foi associado a casos raros de um subtipo de leucemia linfóide crônica denominada leucemia de células “cabeludas” e a raros casos de mielopatia crônica, semelhante a PET/MAH (PROIETTI et al., 2005). Não existem relatos na literatura, até o momento, que associem o HTLV-3 e HTLV-4 a alguma doença (MAHIEUX; GESSAIN, 2008).

A maior parte dos infectados pelos HTLV-1 ou 2 permanece assintomático por um longo período da vida, entretanto sabe-se da correlação da infecção pelos vírus com o desenvolvimento de doenças associadas. Alguns estudos afirmam que 1 a 5% dos indivíduos infectados por HTLV-1 desenvolvem neoplasias associadas ao HTLV de acordo com BANGHAM, (2018), entre 0,25 e 2,0% dos infectados pelo HTLV-1 desenvolvem PET/MAH Loureiro (2008 e Verdonck et al. (2007)

As duas proteínas regulatórias Tax e HBZ, estão relacionadas no processo oncogênico. A expressão de Tax e HBZ podem influenciar os resultados da infecção por HTLV-1 incluindo indução de senescência, latência e persistência viral, instabilidade do genoma, proliferação celular e desenvolvimento de leucemia Giam; Semmes (2016).

Para a infecção crônica por HTLV-1, não existe tratamento com cura permanente nem vacina neutralizante e o fator determinante do desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1 ainda não é bem esclarecido. Uma questão fundamental na pesquisa atual de HTLV-1 é entender melhor a interação dinâmica entre a infecção persistente pelo HTLV-1 e a imunidade do hospedeiro em relação ao vírus Lim; Maini (2014).

Os linfócitos T CD4⁺ são os principais reservatórios de HTLV-1 *in vivo* e desempenham um papel importante na resposta imunológica a estes retrovírus. Esta interação hospedeiro-vírus pode provocar alterações na resposta imunológica, tais como o aumento da produção de citocinas inflamatórias e a proliferação espontânea de linfócitos T CD4⁺, que estão implicados na patogênese da paraparesia espástica tropical Fuzii et al. (2014). Não há evidências absolutas que a carga viral de HTLV-1 esteja associada ao desenvolvimento desta doença. Pois, um terço dos portadores assintomáticos pode ter alta carga viral Coutinho et al. (2014).

2.3 Formas de transmissão dos vírus do grupo HTLV

Os modos conhecidos de transmissão do HTLV são: de mãe para filho, transmissão sexual e a transmissão por transfusão sanguínea (hemoderivados) e transplante de órgãos e tecidos contaminados Gessain; Cassar (2012).

A transmissão sexual ocorre de forma mais eficiente de homens para mulheres e pode ser reforçada por doenças sexualmente transmissíveis que causam úlceras que resultam na ruptura das mucosas, como a sífilis e herpes simplex tipo 2 (HSV-2). Outras doenças sexualmente transmissíveis podem resultar no recrutamento de células inflamatórias que podem aumentar o risco de infecção por HTLV-1. Além disso, os fatores que estão associados com riscos de transmissão mais elevadas incluem a presença de anticorpos contra a proteína viral Tax (anti-tax), além de uma elevada carga pró-viral e do aumento das secreções cérvico vaginal ou seminais. Virions livres foram descobertos em plasma, o que revela um possível modo de replicação diferente do conhecido para o HTLV Paiva; Casseb (2014).

A transmissão por HTLV de mãe para filho ocorre em 15 - 25% dos casos, principalmente através da amamentação. A duração da amamentação e a carga pró-viral estão relacionadas com a transmissão. Em países endêmicos, a triagem pré-natal ou neonatal de rotina combinada com a alimentação controlada do neonato pode ser uma estratégia importante para prevenir o desenvolvimento futuro de doenças relacionadas ao HTLV Ribeiro et al. (2012).

Diferente da transmissão vertical por HIV; a transmissão por vírus do grupo HTLV não ocorre principalmente via transplacentária ou durante o parto. A transmissão é mais frequente durante a amamentação. Mesmo assim, a transmissão vertical pode ocorrer via transplacentária ou por transferência de vírus durante o parto, seja natural ou cesariana, mas essas rotas de infecção são mais raras Carneiro-Proietti et al. (2014). A infecção pelo HTLV-1 durante a amamentação está altamente associada ao desenvolvimento de leucemia de células T associada ao HTLV-1 (ATL). A relação da ATL com a idade sugere um modelo de carcinogênese de várias etapas e de progressão lenta após a infecção pelo HTLV-1 Tsukasaki; Tobinai (2014).

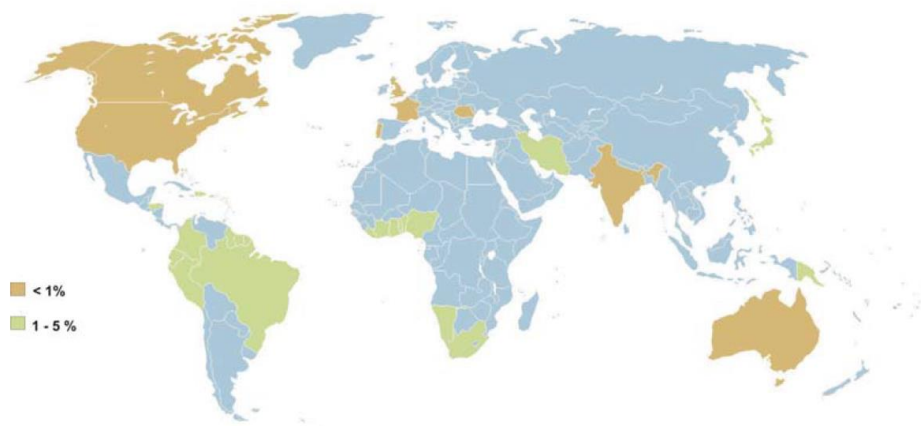
A transmissão via componentes sanguíneos contaminados pelo vírus pode ocorrer nos processos de transfusão além da possível transmissão por transplantes de órgãos e tecidos contaminados. A triagem para o HTLV-1 e 2 de potenciais doadores de sangue é obrigatória no Brasil desde 1993, embora esse rastreamento seja obrigatório, o Ministério da Saúde não exige testes confirmatórios realizados pelos hemocentros Catalan-Soares et al. (2005). No Brasil, encontraram-se prevalências variáveis, sendo a maior ocorrência no estado da Bahia de 1,35% de sorologia positiva entre os doadores de sangue Marano et al. (2015 e Viana et al. (2014, 2015).

Nos demais países da Europa, América do Norte, Japão e Taiwan os doadores de sangue são rotineiramente triados para HTLV-1 e 2 Vrieling; Reesink (2004). Nos levantamentos realizados em doadores de sangue, a infecção pelo HTLV-1 foi mais frequente no Japão e Europa enquanto que nos Estados Unidos ocorre uma maior prevalência da infecção pelo HTLV-2 Marano et al. (2015).

2.4 Prevalência de infecção pelos vírus do grupo HTLV

A FIGURA 3 ilustra a distribuição de infectados pelo HTLV-1 no mundo. A área de maior prevalência tem entre 1 - 5% de infectados; são a América do Sul, África central, o sul da Ásia e o Japão. O sul do Japão foi a primeira região endêmica identificada com prevalência chegando a 37% da população na região mais sudoeste do país. Catalan-Soares et al. (2005)

FIGURA 3: PREVALÊNCIA DE HTLV-1 NO MUNDO



Legenda: Áreas de alta endemia demonstradas em verde, áreas de baixa endemia demonstradas em castanho

Fonte: Catalan-Soares et al. (2005 e Loureiro (2008)

Estima-se que entre 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas com HTLV-1 em todo o mundo com 1,1 milhões dos quais residindo no Japão, e a incidência anual de leucemia de células T em adultos (ATL) foi estimada em cerca de 1.000 casos. Os estudos de prevalência do HTLV nem sempre refletem a realidade epidemiológica. A população amostral baseia-se em doadores de sangue, gestantes, usuários de drogas injetáveis, população carcerária, pacientes neurológicos e hematológicos Santos (2013).

As prevalências de infecção pelo HTLV-1 na população em geral são maiores que 1% na Bacia do Caribe, da África Central, África do Sul e Japão.

As Infecções por HTLV-1 e 2 são encontradas principalmente em grupos de alto risco (ou seja, os imigrantes provenientes de áreas endêmicas, os seus descendentes, seus contatos sexuais, usuários de drogas injetáveis e

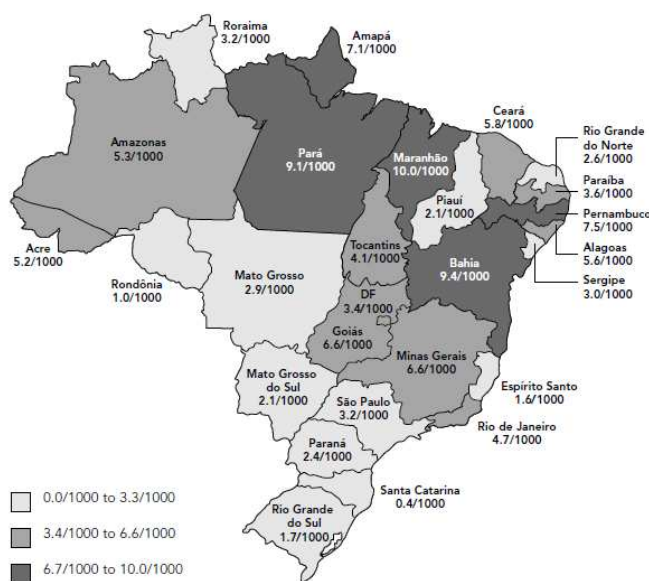
comportamento sexual de risco). Além disso, uma elevada taxa de infecção tanto para HTLV-1 e HTLV-2 foi observada na população indígena nativa tanto na América do Norte quanto na América do Sul.

No Brasil, o vírus HTLV foi identificado pela primeira vez em 1986, na população de imigrantes japoneses no estado do Mato Grosso do Sul Kitagawa et al. (1986).

O vírus do grupo HTLV são encontrados em todos os estados brasileiros, com maior incidência na cidade de Salvador na Bahia de 1,35% entre os doadores de sangue Galvão-Castro et al. (1997 e Pereira et al. (2019).

Entre os anos de 1995 e 2000 foi realizado o mais amplo levantamento sorológico para o HTLV-1 entre os doadores de sangue das 26 capitais brasileiras e Distrito Federal. A prevalência variou de 0,4/1000 em Florianópolis-SC e até 10,0/1000 em São Luís - MA, na região nordeste (FIGURA 4) Catalan-Soares et al. (2005).

FIGURA 4: PREVALÊNCIA DE HTLV-1 EM DOADORES DE SANGUE NAS 26 CAPITAIS BRASILEIRAS E DISTRITO FEDERAL



FONTE: Catalan-Soares et al. (2005)

Os estudos epidemiológicos consistem em amostras restritas a grupos específicos, como por exemplo: doadores de sangue, pacientes de centros de referência DST/AIDS, centros de hemodiálise e hemoterapia etc., portanto, as

estimativas baseiam-se em levantamentos de diferentes estudos sorológicos conduzidos de forma independente e não relacionados.

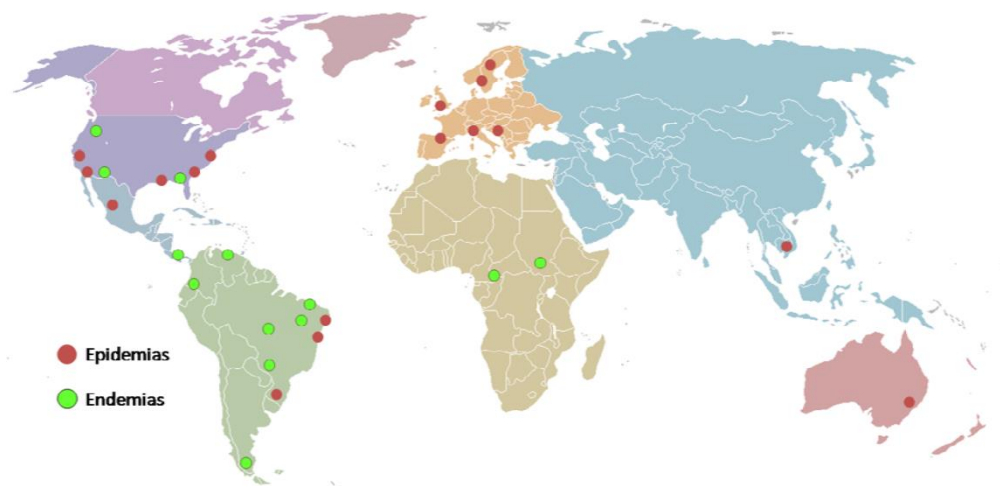
Embora não haja um levantamento epidemiológico abrangente LOUREIRO, (2008) apresenta uma estimativa de cerca de 880 mil infectados no Brasil, este modelo baseia-se no censo populacional correlacionado a soroprevalência descrita por Proietti et al. (2005) e o potencial risco de adoecimento estimado por Murphy et al. (1999 e Verdonck et al. (2007)

A cidade de Salvador na Bahia apresenta a mais elevada prevalência de HTLV-1 no Brasil sendo maior entre as mulheres. A análise filogenética da região LTR do vírus demonstrou que as sequências estudadas eram do subtipo Cosmopolita (a), subgrupo transcontinental (A). A maioria dos imigrantes africanos do Brasil provem da região oeste da África, entretanto nesta região da África somente circula o subgrupo (C). Este fato demonstra que ocorreram múltiplas introduções do HTLV-1 em Salvador e conseqüentemente na população brasileira Castro Filho et al. (2009).

Existe uma escassez de dados de sequências referentes a epidemiologia molecular de HTLV-1. Assim, não é possível delinear um cenário global de infecção por HTLV-1. Dados moleculares relacionados com a epidemiologia devem ser oferecidos com maior frequência e detalhes, porque essas informações são uma importante ferramenta de saúde pública Hialla et al. (2014).

O HTLV-2 parece acometer grupos populacionais distintos e aparentemente não relacionados entre si, distribuindo-se em diversas regiões geográficas (FIGURA 5). O HTLV-2 está presente na população indígena nativa norte americana, e nas populações indígenas da América Central e da América do Sul. Além de estar presente na África central mais especificamente na população de pigmeus e populações mongóis na Ásia. Por outro lado, foi detectado também a presença de HTLV-2 em usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos e Europa. Ishak et al. (2003 e Loureiro (2008)

FIGURA 5: PREVALÊNCIA DE HTLV-2 NO MUNDO



LEGENDA: Áreas endêmicas identificadas em verde e áreas epidêmicas em vermelho
FONTE: Loureiro (2008)

2.5 Proteínas antigênicas determinantes no imunodiagnóstico de HTLV-1 e 2

Os primeiros anticorpos produzidos pelo hospedeiro frente a infecção pelos vírus do grupo HTLV são contra as proteínas estruturais. O gene *gag* codifica as proteínas de matriz viral p19, capsídeo p24 e nucleocapsídeo p15, e o gene *env* codifica as proteínas de envelope gp21 e gp46 e os testes laboratoriais baseiam-se na detecção de anticorpos contra estas proteínas Davi (2015 e Faramarzi; Dolatabadi (2017)

As proteínas gp46, gp21, p19, p24 na forma nativa ou recombinante são determinantes para teste o confirmatório por *Western blot* no diagnóstico de infecção por HTLV Brasil (2010, 2016 e Ministério da Saúde do Brasil (2004 e Saúde (2013).

As proteínas de envelope viral são expressas na superfície de células infectadas e em partículas virais, e são reconhecidas pelo hospedeiro no curso de uma resposta imune natural Sundaram et al. (2004). Peptídeos sintéticos derivados destas proteínas foram usados em ensaios por ELISA para identificar regiões imunogênicas lineares das proteínas gp21 e gp46. De acordo com HORAL et al., (1991) dez epítomos lineares foram identificados. A TABELA 1 descreve estes epítomos.

TABELA 1: EPÍTOPOS LINEARES IDENTIFICADOS POR (HORAL ET AL., 1991)

Proteína	Região	Sequência de aminoácidos
gp46 HTLV-1	176-199	LNTEPSQLPPTAPLLPHSNLDHI
gp46 HTLV-1	190-212	LLPHSNLDHILEPSIPWKSLLT
gp46 HTLV-1	240-262	VLYSPNVSVSSSTPLLYPSLA
gp21 HTLV-1	346-368	SLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKN
gp21 HTLV-1	382-404	GLDLLFWEQGGLCKALQEQCRRFPN
gp21 HTLV-1	467-489	QLRHLPSPRVRYPHYSLIKPESSL
gp46 HTLV-2	85-106	IKKPNRQGLGYSPSYNDPCSL
gp46 HTLV-2	172-195	ITSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHV
gp46 HTLV-2	185-208	PLVHDSLEHVLTPSTSWTTKILK
gp21 HTLV-2	377-400	GLDLLPWEQGGLCKAIQECCFLN

No estudo desenvolvido por Marin et al. (2005) três peptídeos sintéticos foram avaliados em combinações quiméricas derivadas de gp46 e p19 de HTLV-1. As regiões imunogênicas correspondentes à proteína de envelope se sobrepõem aos epítopos descritos por HORAL et al., (1991). A sequência de gp46 composta pelos aminoácidos 190 a 207 (LLPHSNLDHILEPSIPWK) e o peptídeo de mesma sequência no qual a prolina 192 foi substituída por uma serina foram avaliadas em construções em fusão com peptídeos provenientes de p19 de HTLV-1 que abrange a região do aminoácido 105 ao 124 (SPTHDPPDSDPQIPPPYVEP). Neste estudo concluiu-se que a prolina na posição 192 do peptídeo gp46 apresenta maior sensibilidade em relação a construção mutante em que foi substituída pela serina.

O uso de antígenos quiméricos pode ser aplicado para detecção de anticorpos contra mais de uma proteína simultaneamente, a eficiência na detecção depende da ordem da sequência do epítopos Hernández et al. (2000). Num outro estudo conduzido por Hernández Marin, Milenen et al. (2001a) foram sintetizados dois peptídeos quiméricos que incorporam sequências imunodominantes de gp21 e gp46 de HTLV-1. O peptídeo denominado P7 correspondente à proteína gp21 dos aminoácidos 374 a 400 (YAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKALQEQC) e o peptídeo denominado P8 correspondente à proteína gp46 entre os aminoácidos 190 e 207 (LLPHSNLDHILEPSIFWK) foram utilizados em forma de combinações quiméricas espaçados por um *linker* composto por duas glicinas. As quimeras foram avaliadas nas combinações (P7-GG-P8 e P8-GG-P7) sendo a primeira construção mais reativa em relação a combinação P8-GG-P7.

Da mesma forma que o estudo desenvolvido com peptídeos derivados das proteínas de envelope de HTLV-1 Hernández Marin, Milenen et al. (2001a) desenvolveram os peptídeos denominados P2 baseado em gp21 de HTLV-2 constituído pelos aminoácidos 370 ao 396 (YAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKAIQEQC) e o peptídeo P3 constituído pelos aminoácidos 178 ao 205 (QPPPTSPPLVHDSLEHVLTPSTSWTTK) de gp46 de HTLV2. Esses peptídeos foram dispostos de maneira a permitir a obtenção de duas combinações de peptídeos quiméricos (P2-GG-P3 e P3-GG-P2), separados por dois resíduos de glicina. A maior sensibilidade observada na quimera Q5 (P2-GG-P3) pode relacionar-se a acessibilidade dos epítomos em ensaios de fase sólida.

Ainda utilizando de peptídeos quiméricos para imunodiagnóstico de HTLV-2 Hernández Marin et al. (2003) avaliaram a contribuição de peptídeos sintéticos derivados da proteína de matriz p19 de HTLV-2 entre os aminoácidos 116 e 134 (PPSPEAHVPPPYVEPTTTQ) denominado M1 e o peptídeo derivado de gp46 de HTLV-2 entre os aminoácidos 178 e 200 (QPPPTSPPLVHDSLEHVLTPST) denominado M2. Esses peptídeos foram avaliados em forma de monômeros M1 e M2 isoladamente e em forma de quimera QM (M1-GG-M2). Neste estudo concluíram que a construção quimérica demonstrou ser mais eficiente na detecção de anticorpos anti-HTLV-2 quando comparada aos monômeros isolados.

Seguindo os estudo de Bocalandro et al. (2004) utilizaram peptídeos sintéticos derivados de gp21, gp46-1, gp46-2 e p19 monoméricos e quiméricos como antígenos em combinações diferentes P13 (gp21/1), Q5 (gp21/2-GG-gp46/2), e Q (gp46/1-GG-p19/1) num ensaio sorológico de fase sólida e resultaram em alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos Anti-HTLV em amostras de soro provenientes de Cuba, Chile e Colômbia.

Na construção quimérica produzida por FARAMARZI; DOLATABADI, (2017) os epítomos provenientes das proteínas de envelope algumas regiões imunogênicas se sobrepõem as regiões já descritas por Hernández Marin et al. (2003 e Hernández Marin, M et al. (2001 e Horal et al. (1991) aminoácidos de 162 a 214 de gp46 de HTLV-1 (LLVDAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLLPHSNLDHILEPSIPWKS KL), aminoácidos de 160 a 210 de gp46 de HTLV-2

(DAPGYDPLWFITSEPTQPPPTSPPLVHDSLEHVLTPSTSWTTK) e aminoácidos de 370 a 400 de gp21 de HTLV-1 (KIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKALQECCFLNITNSHV). Além das regiões imunogênicas de envelope, esta quimera também foi constituída pelo epítipo formado pelos aminoácidos de 100 a 130 da proteína de matriz p19 de HTLV-1 (PPPPSSPTHDPDSDPQIPPPYVEPTAPQVL). Como *linker* espaçador entre os epítopos foi inserido a sequência EAAAK, a quimera gp46-1+*linker*+gp21-1+*linker*+p19-1+*linker*+gp46-2 foi expressa na forma solúvel em *E. coli*, purificada por afinidade e utilizada em ensaio imunológico por ELISA na qual obteve um desempenho significativo em relação ao ensaio comercial.

A determinação da estrutura tridimensional da proteína de capsídeo de HTLV-1 p24 demonstrou que a proteína consiste em domínios N e C-terminais independentes conectados por um *linker* flexível. Os domínios são estruturalmente semelhantes aos domínios observados no vírus HIV-1 e EAIV-vírus da anemia infecciosa equina Khorasanizadeh et al. (1999).

Após a infecção por vírus do grupo HTLV, os anticorpos para as proteínas gag aparecem precocemente durante a soroconversão, em particular para a proteína de capsídeo p24 MANNS et al., (1991), variantes da proteína p24 recombinantes são utilizadas como antígenos em imunoensaios na detecção das imunoglobulinas anti-p24 do tipo G FAATZ et al. (2017). Deste modo a aplicação de proteína do capsídeo viral de HTLV-1 é crucial na composição de testes diagnósticos

2.6 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico de HTLV-1 baseia-se principalmente no rastreamento de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos (EIA). Os primeiros testes de triagem usavam lisado viral como antígeno. Depois os ensaios passaram a utilizar antígenos e peptídeos recombinantes e sintéticos Andersson et al. (1999). Com o aumento do conhecimento sobre a propagação do vírus e as doenças associadas, o diagnóstico também foi aprimorado Thorstensson et al. (2002).

A detecção da infecção por HTLV ocorre em maior frequência pelo uso de ensaios imunológicos. Embora os testes atuais tenham alta sensibilidade e especificidade, em regiões de baixa prevalência, um número significativo de

reações falso-positivas ainda ocorre Campos et al. (2017 e Tosswill; Taylor (2018) é necessária uma avaliação sistemática da precisão dos testes comerciais atualmente disponíveis Da Silva Brito et al. (2018).

A presença simultânea de anticorpos contra as proteínas de envelope viral gp21 e gp46, proteína de capsídeo p24 e proteína de matriz p19 é aplicada como teste confirmatório da infecção pelo vírus em testes laboratoriais pelo método de *Western blot*. Nos ensaios comerciais por ELISA são estas mesmas proteínas expressas de forma recombinante que asseguram a detecção de anticorpos específicos contra o vírus Faramarzi; Dolatabadi (2017 e Mosadeghi et al. (2015 e Zarnagh et al. (2015).

Num estudo conduzido por DA SILVA BRITO et al., (2018b) 370 amostras sorológicas foram utilizadas para avaliação de testes comerciais baseados em ensaios por ELISA. Todos os testes de triagem demonstraram 100% de sensibilidade. Em relação às amostras negativas para HTLV-1 e 2, os kits SYM Solution e Gold ELISA apresentaram valores de especificidade maiores que 99,5%, enquanto o teste Architect rHTLV-1/2 apresentou especificidade de 98,1%, seguido pelo Murex, com especificidade de 92,0%.

2.7 Expressão de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

Desde o início da década de 1970, com o advento da tecnologia do DNA recombinante, proteínas passaram a ser expressas em variados organismos hospedeiros. O resultado foi a obtenção facilitada de uma vasta gama de proteínas de aplicação biotecnológica. Entretanto, para se produzir uma proteína recombinante é necessário primeiramente obter a sequência gênica codificante em vetores de expressão apropriados ao modelo celular escolhido Davi (2015).

Devem ser avaliadas as características da proteína de interesse, necessidade de modificações pós-traducionais, peptídeo sinal, atividade biológica e outros aspectos quando se determina a célula hospedeira e sistema de vetor para expressão recombinante. Os sistemas de vetor para expressão possuem os elementos necessários para controlar a expressão de proteínas, a sequência da origem de replicação (*Ori*) controla a taxa de replicação e a

seleção das colônias que receberam o inserto adequado é facilitada pelos genes de resistência a antibióticos presentes nos vetores Davi (2015 e Rosano, Germán L.; Ceccarelli (2014).

Os vetores ainda permitem o direcionamento da sequência de interesse através dos múltiplos sítios de clonagem. Além disso, os plasmídeos ainda possuem sequências para o controle da tradução como um sítio de ligação ao ribossomo (sequência de Shine-Dalgarno), uma sequência ATG como iniciador e um códon de parada para terminar a tradução Palomares et al. (2014).

O sistema de expressão em *E. coli* é ainda um dos mais vantajosos sistemas de expressão recombinante devido ao seu rápido crescimento em meios de cultura simples e de baixo custo, genética bem estabelecida e a disponibilidade de inúmeros vetores e cepas específicas Makrides (1996).

Apesar dos avanços biotecnológicos o sistema bacteriano de expressão ainda apresenta algumas limitações. Algumas modificações pós-traducionais ainda não são possíveis como a glicosilação específica. As proteínas recombinantes ainda podem sofrer ação de proteases, dobramento inadequado e ser produzidas em forma de agregados insolúveis em corpos de inclusão Costa et al. (2014 e Davi (2015). Entretanto, algumas estratégias podem ser usadas para evitar a formação dos corpos de inclusão. Uma delas é realizar a expressão em baixas temperaturas, o que resulta na diminuição do grau de transcrição, tradução e redução das forças de interação hidrofóbicas, as quais contribuem para o dobramento errôneo da proteína Jevševar et al. (2008).

Por se tratar de um sistema simples e de baixo custo, cepas geneticamente modificadas tem sido constantemente produzidas para se tornar um sistema eficiente de produção de proteínas recombinantes Costa et al. (2014 e Davi (2015 e Lebendiker; Danieli (2014 e Rosano, Germán L.; Ceccarelli (2014).

2.8 Demanda de testes sorológicos.

A segurança do sangue para transfusão e seus derivados para utilização médica é baseada em várias medidas de triagem de doadores e testes imunológicos e moleculares que visam reduzir o risco de transmissão de

doenças infecciosas por transfusão e transplantes. A implementação destes testes proporcionou maior segurança nas transfusões sanguíneas quanto à infecção por patógenos específicos HIV, HBV, HCV e HTLV tornando as infecções via transfusão sanguínea extremamente raras. Laperche et al. (2015). Muitos países atualmente realizam triagem de anticorpos para infecção por HTLV-1 em doadores de sangue, tanto em países de alta incidência quanto em países de baixa incidência Murphy (2016).

No Brasil existe uma política de saúde pública para a definição de medidas em centros de Hematologia e Hemoterapia, a fim de evitar a transmissão do vírus através de doações de sangue Viana et al. (2014). A resolução nº57 de 2010 da ANVISA ratificada pela resolução nº158 de 2016, que trata dos exames de qualificação do sangue de doadores determina a obrigatoriedade da realização de testes de triagem sorológica nos serviços de hemoterapia para sífilis, doença de Chagas, hepatites A, B e C, HIV-1/2, HTLV-1/2 e malária. Atualmente, a pesquisa para HTLV-1/2 é realizada pelo método de ELISA com uso de kits comerciais importados Brasil (2010 e SAÚDE (2016).

Os kits diagnósticos utilizados nos bancos de sangue nacionais e nos laboratórios de análises clínicas são, na sua maioria, comprados de empresas estrangeiras. Entre as empresas que comercializam conjuntos diagnósticos para HTLV-1 estão a BioMeriex (USA), Murex (França), Genelabs (USA) e Abbott (USA) Davi (2015 e Da Silva Brito et al. (2018).

O Brasil apresenta importante dependência tecnológica externa no que diz respeito ao acesso a novos fármacos e medicamentos, equipamentos de saúde, hemoderivados, vacinas e insumos para diagnóstico Gadelha; Costa (2007 e Da Silva Brito et al. (2018).

Em países de alta renda, a segurança da transfusão de sanguínea em relação à infecção por HTLV atingiu um nível muito elevado, especialmente graças a implementação de várias medidas baseadas na qualificação das bolsas de sangue e mesmo tratamentos físico/químicos destinadas a reduzir o risco de transmissão viral Laperche; Pillonel (2014).

Em paralelo com o controle de qualidade do sangue e seus derivados uma série de doenças infecciosas deve ser considerada como parte dos cuidados pré-natais, devido a severidade de complicações clínicas que podem ocasionar na mãe e/ou feto Coonrod et al. (2008 e Figueiró-Filho et al. (2007). Atendendo

as diretrizes de prevenção da transmissão vertical de DST/AIDS, o Sistema Único de Saúde (SUS) instituiu no programa Rede Cegonha, a triagem sorológica pré-natal de rubéola, sífilis, toxoplasmose, HIV-1/2, hepatites B e C, HTLV-1 e 2, doença de Chagas e malária em regiões endêmicas Brasil (2006, 2013).

Como a via mais frequente de transmissão vertical do HTLV-1 está na amamentação, e considerando a prevalência mais elevada nas mulheres, é muito importante a detecção de anticorpos anti-HTLV-1 como parte da rotina pré-natal. É necessário enfatizar que a falta de triagem de HTLV-1 em mulheres grávidas pode promover a transmissão especialmente em áreas endêmicas. A triagem de HTLV nesta população “vulnerável” e os cuidados com crianças de mães soropositivas podem ser importantes métodos de baixo custo para limitar a transmissão vertical. Além disso, a necessidade de estabelecer estratégias de vigilância ativa na casa e contatos familiares como importantes ações de vigilância epidemiológica para a detecção precoce da infecção pelo vírus e a prevenção da transmissão por contato ou sexual e parenteral Mello et al. (2014).

Os kits diagnósticos atualmente disponíveis no mercado e que são utilizados nos laboratórios clínicos e nos bancos de sangue no Brasil, utilizam, na sua maioria, as proteínas recombinantes p19, gp21, p24 e gp46 como seus componentes. Dessa forma, a produção dessas quatro proteínas de forma recombinante é o primeiro passo para o desenvolvimento de kits diagnósticos com tecnologia nacional. Esses kits devem ser baseados em metodologias simples, para fácil manuseio pelo profissional de saúde e sem exigir equipamentos caros, devem ser baratos para se produzir, sensíveis e específicos Davi (2015).

Assim, este trabalho propõe-se a desenvolver um conjunto de antígenos capazes de detectar anticorpos anti-HTLV-1 e 2 com alta sensibilidade e especificidade, que visam suprir a carência de desenvolvimento tecnológico que busca reduzir custos em triagem sorológica nos hemocentros e centros de atenção básica a saúde.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Selecionar e produzir antígenos recombinantes para padronizar e validar técnicas sorológicas no diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 (vírus linfotrópicos humanos de células T).

3.2 Objetivos específicos

a- Identificar um conjunto potencial de antígenos que permitam diagnóstico sorológico com alta sensibilidade e especificidade para infecção por HTLV-1 e HTLV-2. Considerando a variabilidade de sequências aminoacídicas que compõem os subtipos de HTLV;

b- Definir as construções genéticas levando em conta a estrutura das proteínas e as regiões imunogênicas visando obter construções adequadas para a expressão em *Escherichia coli*;

c- Padronizar a expressão e purificação dos antígenos de HTLV-1 e 2 em *Escherichia coli*;

d- Validar os antígenos através imunoensaios pelo método de ELISA, empregando soros positivos e negativos para HTLV;

4. METODOLOGIA

4.1 Avaliação da divergência genética entre os antígenos dos subtipos de HTLV

A partir das sequências identificadas, primeiramente analisamos a identidade de sequência de aminoácidos em relação às sequências de demais patógenos que podem oferecer risco de reação cruzada na detecção de anticorpos anti-HTLVs. As sequências foram alinhadas por BlastP no NCBI em <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. A variabilidade genética e grau de conservação das sequências disponíveis de proteínas antigênicas de HTLV-1 e 2 foi verificada alinhando-se as sequências de aminoácidos das proteínas disponíveis no Genbank. Para critérios de inclusão das sequências nas análises, selecionamos apenas sequências com número de resíduos de aminoácidos igual ou superior à sequência de proteínas selecionadas para desenvolvimento dos antígenos. Após a seleção das sequências disponíveis no Genbank realizamos um alinhamento múltiplo usando o programa computacional MUSCLE - Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation Edgar (2004). A distância p que representa o grau de distância de uma sequência foi obtida a partir do programa MEGA 6 - Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, Tamura et al. (2013). Para analisar a conservação das proteínas entre HTLV-1 e HTLV-2, escolhemos aleatoriamente uma sequência completa de cada tipo e alinhamos no Genedoc. A identidade e a similaridade das sequências de aminoácidos foram indicadas pelo mesmo programa.

4.2 Obtenção das sequências gênicas

As sequências de aminoácidos que compõem as proteínas dos vírus HTLV-1 e 2 foram obtidas do Genbank do NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/).

A partir da sequência de aminoácidos do antígeno, é feita a dedução da sequência de nucleotídeos, sendo que antes da síntese as sequências nucleotídicas são otimizadas para expressão em *Escherichia coli*. Os aspectos

genéticos otimizados nos genes sintéticos incluem taxa de utilização de códons (*códon usage*) e redução de: repetições de códons in tandem, estruturas secundárias, elementos de desestabilização do RNA mensageiro (mRNA), distribuição do conteúdo de resíduos G-C (Guanina-Citosina), repetições de longa amplitude e sequências codificadoras secundárias. Além disso, aplica-se um filtro para excluir da região interna da sequência codificadora os sítios das enzimas de restrição que serão utilizadas nas etapas de subclonagem nos vetores de expressão.

As sequências nucleotídicas foram sintetizadas pela empresa *GenScript* (Piscataway, NJ, EUA) no vetor de clonagem pUC57 para as construções Ag 2-2, 2-4 de HTLV-1 e Ag 3-1 e 3-3 de HTLV-2. E as construções antigênicas Ag 2-12, 2-13, 2-14, 2-15 e 2-16 de HTLV-1 e Ag 3-4, 3-5 e 3-7 de HTLV-2 foram obtidas em genes sintéticos clonados no vetor de expressão pET28a. A TABELA 2 descreve as sequências genicas referente aos clones.

TABELA 2: SEQUÊNCIA GENICA DOS CLONES

Clone	Sequência nucleotídica	Sítios de clonagem	Vetor
2-2	CCATGGCTGGATCCGTGGACGCTCCGGGCTACGACCCGATTGTTGTT TCTGAACACCGAACCAGTCAACTGCCGCCGACCGCACCGCCGCT GCTGTCTCACTCAAACCTGGATCATATTCTGGAACCGAGCATCCCCG TGGAATCTAAGCTGCTGACCCCTGGTTTCAGCTGACGCTGCAATCG ACCAACTATACGTGCATTGTTTGTATCGACCGTGCATCACTGTCTGA CCTGGCAGCTCCTGTATAGTCCGAATGTGAGCGTTCCGTCTCCGAG CTCTACGCCGCTGCTGTACCCGTCCCTGGCACTGCCGGCACCCGAT CTGACCCCTGCCGTTTAACTGGACGCACTGCTTCGATCCGCGAGATT AAGCGATCGTTAGTTCCCGGTGTCATAATCACTGATTCTGCCGCC GTTTAGCCTGTCTCCGGTGCCGACCCCTGGGCAGTCGTTCCCGTCGC CAGTCCCGGTGGCAGTTTGGCTGGTCTCTGCACTGGCTATGGGCG CCGTGTGGCTGGTCTGATTACCGGTTCAATGTCGCTGGCCAGTGG TAAATCCCTGCTGCATGAAGTGGATAAGGACATTAGTCAGCTGAC CCAAAGCAATCGTTAAAAACCAACAAGAATCTGCTGAAAAATCGCTCA GTACGCGGCCCAAAATCGTCGCGGCTGGATCTGCTGTTTGGGA ACAGGGCGGTCTGTGCAAAGCGCTGCAGGAACAATGCTGTTTCCT GAACATTACCAATTACACGCTCTCGATCTGCAGGAACGTCGCC GCTGGAAAACCGTGTGCTGACGGGTGGGGTCTGAATTGGGACCT GGGTCTGAGCCAGTGGGCCCGCGCAATTCCTGATAAAAGCTT	<i>Bam</i> HI – <i>Hind</i> III	pUC57
2-4	CCATGGCTGGATCCGCGTCAATGAAGGACCTGCAAGCAATCAAGC AAGAAGTCAGTCAAGCCGCACCGGTTCCGCCGAATTTATGCAAA CGATCCGCTTGCCCGTGCAGCAATTTGATCCGACCGCAAAAGATC TGCAAGACCTGCTGCAGTATCTGTGCAGCTCTCTGGTTGCAAGCCT GCATCACCAGCAACTGGACTCACTGATTTCCGAAGCGGAAACCCG TGGCATCACGGGTATTAACCCGCTGGCTGGTCCGCTGCGTGTCCAG GCAAACAATCCGCAGCAACAGGGTCTGCGTCGCGAATACCAACAG CTGTGGCTGGCAGCATTGTCAGCTCTGCCGGGCTCTGCCAAAGATC CGAGCTGGGCATCTATTCTGCAGGGTCTGGAAGAACCGTATCATG CTTTCGTTGAACGCTCTGAACATTGCCCTGGATAATGGTCTGCCGGA AGGTACCCGAAGGACCCGATCCTGCGCAGTCTGGCTTACTCCAA CGCGAATAAAGAATGTCAAAGCTGCTGCAGGCACGTGGTCAAC GAATAGCCCGCTGGGTGATATGCTGCGTGCATGCCAGGCGGTAG TTCTGTGCGGCCCGCAGCGAATTCCTGATAAAAGCTT	<i>Bam</i> HI - <i>Hind</i> III	pUC57
2-12	AAAACCAAAGCGCTGGGCGGCAGCGCGATGAGCCTGGCGAGCGG CAAAAGCCTGCTGCATGAAGTGGATAAAGATATTAGCCAGCTGAC CCAGGCGATTGTGAAAAACCATAAAACCTGCTGAAAAATTGCGCA GTATGCGCGCAGAACCCGCGCGGCTGGATCTGCTGTTTGGGA ACAGGGCGGCTGTGCAAAGCGCTGCAGGAACAGTCTGCTTTCT GAACATTACCAACAGCCATGTGAGCATTCTGCAGGAACGCCCGCC GCTGGAAAACCTCGAG	<i>Nco</i> I - <i>Xho</i> I	pET28a

2-13	CCATGGCGAAAGATCCGAGCTGGGCGAGCATCTGCAGGGCCTGGA AGAACCGTATCATGCGTTTGTGGAACGCTGAACATTGCGCTGGA TACGGCCTGCCGGAAGGCACCCGAAAGATCCGATTCTGCGCAGC CTGGCGTATAGCAACGGAACAAAGATGCCAGAACTGCTGCAGG CGCGCGCCATACCAACAGCCCGCTGGGCATATGCTGCGCGCTG CCAGACCTGGACCCCGAAAGATAAAACGCGCTGGGCGGCG CAAATTTGCGCAGTATGCGGCGCAGAACCGCGCGGCTGGATCT GCTGTTTTGGGAACGGGCGGCTGTGCAAAAGCGCTGCAGGAACAG TGCTGTTTTCTGAACATTACCAACAGCCTGTGAGCATTTCTCAGGA ACGCCCCCG CTGGAACCTCGAG	<i>NcoI - XhoI</i>	pET28a
2-14	CCATGGCGAGCATGAAAGATCTGCAGGCGATTAAACAGGAAGTGA GCCAGGCGGCGCCGGGAGCCCGCAGTTTATGCAGACCATTCGCC TGCGGTTGCAGCAGTTTATCCGACCGCGAAAGATCTGCAGGATC TGCTGCAGTATCTGTGCAGCAGCCTGGTGGCGAGCCTGCATCATCA GCAGCTGGATAGCCTGATTAGCGAAGCGGAAACCCGCGGCATTAC CGGTATAACCCGCTGGCGGGCCCGCTGCGCGTGCAGGCGAACA CCCGCAGCAGCAGGGCCTGCGCCGCGAATATCAGCAGCTGTGGCT GGCGGCGTTTGGCGGCTGCCGGGAGCGCGAAAGATCCGAGCTG GGCGAGCATTCTGCAGGGCTGGAAGAACCCTATCATGCGTTTGT GGAACGCTGAACATTGCGCTGGATAACGGCCTGCCGGAAGGCAC CCGAAAGATCCGATTCTGCGCAGCCTGGCGTATAGCAACGCGAA CAAAGAATGCCAGAACTGCTGCAGGCGCGCGGCCATACCAACA GCCCCGTGGGCGATATGCTGCGCGCTGCCAGACCTGGACCCCGA AAGATAAAACCAAGCGCTGGGCGGAGCCTGCTGGTGGATGCGC CGGCTATGATCCGATTGGTTTCTGAACACCGAACCAGCCAGCT GCCGCGACCGCGCCGCTGCTGCCGATAGCAACCTGGATCA TATTCTGGAACCGAGCATTCCTGGAAAGCAAACTGCTGACCCT GGTGAGCTGACCTGCAGAGCACCAACCTCGAG	<i>NcoI - XhoI</i>	pET28a
2-15	CCATGGCGAGCATGAAAGATCTGCAGGCGATTAAACAGGAAGTGA GCCAGGCGGCGCCGGGAGCCCGCAGTTTATGCAGACCATTCGCC TGCGGTTGCAGCAGTTTATCCGACCGCGAAAGATCTGCAGGATC TGCTGCAGTATCTGTGCAGCAGCCTGGTGGCGAGCCTGCATCATCA GCAGCTGGATAGCCTGATTAGCGAAGCGGAAACCCGCGGCATTAC CGGTATAACCCGCTGGCGGGCCCGCTGCGCGTGCAGGCGAACA CCCGCAGCAGCAGGGCCTGCGCCGCGAATATCAGCAGCTGTGGCT GGCGGCGTTTGGCGGCTGCCGGGAGCGCGAAAGATCCGAGCTG GGCGAGCATTCTGCAGGGCTGGAAGAACCCTATCATGCGTTTGT GGAACGCTGAACATTGCGCTGGATAACGGCCTGCCGGAAGGCAC CCGAAAGATCCGATTCTGCGCAGCCTGGCGTATAGCAACGCGAA CAAAGAATGCCAGAACTGCTGCAGGCGCGCGGCCATACCAACA GCCCCGTGGGCGATATGCTGCGCGCTGCCAGACCTGGACCCCGA AAGATAAAACCAAGCGCTGGGCGGAGCAGCACCTGGCATGTG CTGTATAGCCGAACTGAGCGTGCCGAGCAGCAGCAGCAGCCCCG CTGTTTTATCCGAGCCTGGCGCTCGAG	<i>NcoI - XhoI</i>	pET28a
2-16	CCATGGCGAGCATGAAAGATCTGCAGGCGATTAAACAGGAAGTGA GCCAGGCGGCGCCGGGAGCCCGCAGTTTATGCAGACCATTCGCC TGCGGTTGCAGCAGTTTATCCGACCGCGAAAGATCTGCAGGATC TGCTGCAGTATCTGTGCAGCAGCCTGGTGGCGAGCCTGCATCATCA GCAGCTGGATAGCCTGATTAGCGAAGCGGAAACCCGCGGCATTAC CGGTATAACCCGCTGGCGGGCCCGCTGCGCGTGCAGGCGAACA CCCGCAGCAGCAGGGCCTGCGCCGCGAATATCAGCAGCTGTGGCT GGCGGCGTTTGGCGGCTGCCGGGAGCGCGAAAGATCCGAGCTG GGCGAGCATTCTGCAGGGCTGGAAGAACCCTATCATGCGTTTGT GGAACGCTGAACATTGCGCTGGATAACGGCCTGCCGGAAGGCAC CCGAAAGATCCGATTCTGCGCAGCCTGGCGTATAGCAACGCGAA CAAAGAATGCCAGAACTGCTGCAGGCGCGCGGCCATACCAACA GCCGCTGGGCGATATGCTGCGCGCTGCCAGACCTGGACCCCGA AAGATAAAACCAAGCGCTGGGCGGAGCCGAGCAGCCGACC CATGATCCGCGGATAGCGATCCGAGATTCCGCCGCCGTATGTG GAACCGACCGCGCCGAGGTGCTGCTCGAG	<i>NcoI - XhoI</i>	pET28a
3-1	CCATGGCTGGATCCGTTGACGCTCCGGGCTATGACCCGCTGTGGTT TATTACCTCCGAACCGACGCAACCGCCGCCGACGCCGCGCCGCT GGTGCAGATAGCGATCTGGAACATGTGCTGACCCCGAGTACGCT CTGGACCAGAAAATGCTGAAGTTTATCCAGCTGACCCCTGCAAA CAGGAATATTCTGCTGCTGCTGTGTTGACCGTAGCTCTCTGAGT TCCTGGCATGTTCTGTACACCCGAATATTAGTATCCCGCAGCAAA CCTCATCGCGCAGCATCCTGTTCCCGTCTTGCGACTGCCGGCACC GCCGTTTCAGCCGTTCCCGTGACCCACTGCTATCAGCCGCTGTG CAAGCCATTACCACGGATAACTGTAACAATTCAATTATCCTGCCGC CGTTTTGCTGGCACCAGTCCCGCCGCGGCAACCCGTCGCCGTCG CGAGTGCCGATCGCTGTTGGTTCTGTCAGCGCACTGGCAGCAGGT ACCGGATTGCTGGCGGTGTTACGGGCTCACTGTCGCTGGCAGCT CTAAAAGCCTGCTGTTTGAAGTCGATAAGGACATTTCTCATCTGAC CCAGGCGATCGTGAAAAACCAAAAATATTCTGCGTGTGCCCCA GTACGCACTCAAAACCGTCGCGGTCTGGATCTGCTGTTTTGGGAA CAGGGCGGTCTGTGAAAGCAATCCAGGAACAATGCTGTTTCCTG AACATTAGTAATACCCAGCTCTCCGTGCTGCAGGAACGTCGCCG CTGGAAGAGCGGTGATTACGGGCTGGGCTGTAATTGGGACCTG GGCTGTCCAGTGGGCTCGCGCAATTCCTGATAAAAGCTT	<i>BamHI - HindIII</i>	pUC57
3-3	CCATGGCTGGATCCATGAAAGATCTGCAGGCAATTAAACAAGAAG TTAGCTCTAGTGCTCCGGGCTACCCGAGTTTATGCAAAACCTGCG TCTGGCAGTCCAGCAATTCGACCCGACGGCTAAAGATCTGCAGGA CCTGCTGCAATATCTGTGCTCCTCACTGGTGGTTAGCCTGCATCAC CAGCAACTGAACACCTGATCACGGAAGCCGAAACCCGTGGCGTG ACGGGTTATAATCCGATGCGGGTCCGCTGCGTATGCAGGCAAA AATCCGGCTCAGCAAGGTCTGCGTCGCGAATACCAGAACCTGTGG	<i>BamHI - HindIII</i>	pUC57

	CTGGCGGCTTTTCTACCTGCCGGGCAATACGCGCATCCGAGTT GGGACGTATTCTGCAGGTCTGGAAGAACCCTATTGTGCGTTCTG CGAACGTCTGAACGTGGCCCTGGACAATGGCCTGCCGGAAGGTAC CCCGAAAGAACCCTGCTGCGCTCGCTGGCGTACAGCAACGCCAA TAAAGAATGCCAGAAAATCCTGCAAGCGCTGGCCATACCAATC CCCGCTGGGTGAAATGCTGCGCGCTGTACGGCCGCGAATTCCTG ATAAAAGCTT		
3-4	CCATGGGCCATCATCATCATCATCATCATCATCATCATAGCAGCGG CCATATGGGCCAGATTTCATGGCCTGAGCCCGACCCCGATTCCGAA AGCGCCGCGCGCCCTGAGCACCCATCATTGGCTGAACCTTCTGCA GGCGGCGTATCGCTGCAGCCGGGCGCCGAGCGATTTGATTTTCAG CAGCTGCGCCGCTTTCTGAAACTGGCGCTGAAAACCCCGATTGG CTGAACCCGATTGATTATAGCTGCTGCGGAGCCTGATTCCGAAA GGCTATCCGGGCGCGTGGTGGAAATTATTAACATTCTGGTGA AACCCAGGTGAGCCGAGCGCGCGCGCGCGCGCGTCCGAGCCCG ATTAGCCCGACCCACCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGAGCCCG GAAGCGCATGTGCCGCGCCGCTATGTGGAACCGACCCACCCAG AGCTTTTAACTCGAG	<i>NcoI</i> - <i>XhoI</i>	pET28a
3-5	CCATGGCGGGCAGCATGAAAGATCTGCAGGCGATTAAACAGGAA GTGAGCAGCAGCGCGCCGGGCGAGCCCGCAGTTTATGCAGACCCTG CGCTGGCGGTGCAGCAGTTTGATCCGACCGCGAAAGATCTGCAG GATCTGCTGCAGTATCTGTGCAGCAGCCTGGTGGTGAGCCTGCATC ATCAGCAGCTGAACACCCTGATTACCGAAGCGGAAACCCGCGGCG TGACCCGCTATAACCCGATGGCGGGCCCGCTGCGCATGCAGGCGA ACAACCCGCGCAGCAGGGCCTGCGCCGCGAATATCAGAACCTGT GGCTGGCGGCGTTTAGCACCTGCCGGGCAACACCCGCGATCCGA GCTGGGCGGCGATTCTGCAGGGCCTGGAAGAACCCTATTGCGCGT TTGTGGAACGCTGAACGTGGCGCTGGATAACGCGCTGCCGGAAG GCACCCCGAAAGAACCCTGCTGCGCAGCCTGGCGTATAGCAACG CGAACAAAGAATGCCAGAAAATTCTGCAGGCGCGCGGCCATACCA ACAGCCCGCTGGGCGAAATGCTGCGCGCTGCCAGGCGGGCGGCA GCCTGAGCTGGCGAGCAGCAAAAGCCTGCTGTTGAAGTGGATA AAGATATTAGCCATCTGACCCAGGCGATTGTGAAAAACCATCAGA ACATTCTGCGCGTGGCGCAGTATGCGGCGCAGAACCGCCGCGGCC TGGATCTGCTGTTTGGGAACAGGGCGGCGCTGTGCAAGCGATTG AGGAACAGTGCTGCTTTCTGAACATTAGCAACACCCATGTGAGCG TGCTGCAGGAACGCGCCGCGCTGGA AAAACGCGTGATTACCGCT GGGCGCTGAACTGGGATCTGGGCCTGAGCCAGTGGCGCGCCTCG AG	<i>NcoI</i> - <i>XhoI</i>	pET28a
3-7	CCATGGCGGGCAGCATGAAAGATCTGCAGGCGATTAAACAGGAA GTGAGCAGCAGCGCGCCGGGCGAGCCCGCAGTTTATGCAGACCCTG CGCTGGCGGTGCAGCAGTTTGATCCGACCGCGAAAGATCTGCAG GATCTGCTGCAGTATCTGTGCAGCAGCCTGGTGGTGAGCCTGCATC ATCAGCAGCTGAACACCCTGATTACCGAAGCGGAAACCCGCGGCG TGACCCGCTATAACCCGATGGCGGGCCCGCTGCGCATGCAGGCGA ACAACCCGCGCAGCAGGGCCTGCGCCGCGAATATCAGAACCTGT GGCTGGCGGCGTTTAGCACCTGCCGGGCAACACCCGCGATCCGA GCTGGGCGGCGATTCTGCAGGGCCTGGAAGAACCCTATTGCGCGT TTGTGGAACGCTGAACGTGGCGCTGGATAACGCGCTGCCGGAAG GCACCCCGAAAGAACCCTGCTGCGCAGCCTGGCGTATAGCAACG CGAACAAAGAATGCCAGAAAATTCTGCAGGCGCGCGGCCATACCA ACAGCCCGCTGGGCGAAATGCTGCGCGCTGCCAGGCGGGCGGCA GCATGCGCGGGCTATGATCCGCTGTGGTTTATTACAGCGAACCC GACCCAGCGCGCGCGACCCCGCGCGCGCTGGTGCATGATAGCGA TCTGGAACATGTGCTGACCCCGAGCAGCTGGACCACCAAAAT GCTGAAACTCGAG	<i>NcoI</i> - <i>XhoI</i>	pET28a

Nota: Os códigos dos clones foram determinados de acordo com a ordem de solicitação, o mesmo código definido foi aplicado aos antígenos correspondentes.

Fonte: O Autor

O planejamento das construções genéticas para expressão dos antígenos foi realizado a partir de sequências aminoacídicas de proteínas inteiras e regiões antigênicas já mapeadas. Os antígenos alvos deste estudo foram selecionados com base nas proteínas estruturais dos vírus HTLV-1 e HTLV-2 já descritas na literatura seguindo as diretrizes de triagem sorológica laboratorial preconizada pelo Ministério da Saúde Ministério da Saúde do Brasil (2004). Estas foram feitas para expressão de proteínas únicas e construções quiméricas descritas resumidamente na TABELA 3.

TABELA 3: DESCRIÇÃO DOS CLONES CONSTRUÍDOS

	Código	Gene	Antígeno	Regiões utilizadas nas construções	Genbank
HTLV-1	Ag 2-2	<i>env</i>	Quimera gp21 + gp46	Env (166 – 440)	NP_057865.1
	Ag 2-4	<i>gag</i>	p24	Gag p24 (17 – 215)	X91888.1
	Ag 2-5	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp21	Gag p24 (17 – 215) Env gp21 (338 – 421)	X91888.1 NP_057865.1
	Ag 2-7	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp46	Gag p24 (17 – 215) Env gp46 (166 – 340)	X91888.1 NP_057865.1
	Ag 2-12	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp21	Gag p24 (130 – 217) Env gp21 (338 – 421)	1QRJ_A BAD95661.1
	Ag 2-13	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp21	Gag p24 (130 – 217) Env gp21 (404 – 456)	1QRJ_A BAD95661.1
	Ag 2-14	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp46	Gag p24 (17 – 215) Env gp46 (162 – 222)	1QRJ_A AAF66016.1
	Ag 2-15	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp46	Gag p24 (17 – 215) Env gp46 (235 – 261)	1QRJ_A AAF66016.1
	Ag 2-16	<i>gag</i>	Quimera p24 + p19	Gag p24 (17 – 204) Gag p19 (103 – 130)	1QRJ P03362.3
HTLV-2	Ag 3-1	<i>env</i>	Quimera gp21 + gp46	Env (161 – 436)	CAA61545
	Ag 3-3	<i>gag</i>	p24	Gag p24 (17 – 203)	NP_954567.1
	Ag 3-4	<i>gag</i>	p19	Gag p19 (02 - 138)	1JVR
	Ag 3-5	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp21	Gag p24 (17 – 203) Env gp21 (334 – 436)	NP_954567.1 CAA61545
	Ag 3-7	<i>gag env</i>	Quimera p24 + gp46	Gag p24 (17 – 203) Env gp46 (160 – 210)	NP_954567.1 CAA61545

Fonte: O Autor

4.3 Subclonagem dos genes sintéticos em vetor de expressão

A sequência codificadora dos diferentes clones recebidos em pUC57 foram isolados através de clivagem com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III. Após a digestão, os fragmentos foram excisados do gel de agarose e purificados com o kit de extração de DNA (Qiagen). O vetor pET28a foi linearizado pela clivagem com as mesmas enzimas de restrição, desfosforilados e ligados com os fragmentos isolados purificados, através da ligação catalisada pela enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific).

O produto da ligação foi transformado em células competentes da cepa DH5α de *E. coli*, preparadas através do tratamento do cloreto de cálcio Hanahan (1983). Para identificação dos clones corretos o DNA plasmideal de diferentes colônias de cada antígeno foi extraído por lise alcalina Green; Sambrook (2018), clivados com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e

analisado por eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio (0,5 µg/L).

Uma das colônias portando o inserto com o tamanho esperado foi utilizada para transformar a cepa de *E. coli* DH5α cálcio-competente para preparar DNAs estoque dos clones. Para isso, as bactérias cresceram em 100 ml de meio LB (Luria-Bertani) com o antibiótico correspondente a este vetor (Canamicina, 50 µg/ml) a 37°C a 200 rpm por um período de aproximadamente 16 horas (over night). Os plasmídeos foram purificados através do kit MidiPrep Plasmid Purification (Qiagen).

4.4 Transformação de bactérias *E. coli* BL21 - Star (DE3) por choque térmico

Alíquotas (50 µL) de células BL21 - Star (DE3) quimio competentes mantidas a -80°C foram descongeladas em gelo e a elas adicionado 1 a 5 µL (100ng) de DNA plasmidial. As células foram mantidas em gelo por 30 minutos, e então submetidas a choque térmico de 42°C por 2 minutos e retornando o gelo por mais 5 minutos. Em seguida foi adicionado 1 ml de meio SOC. As suspensões de células foram mantidas a 37°C sob agitação de 200 rpm por 90 minutos e posteriormente plaqueadas em meio LB suplementado com canamicina (50 µg/ml).

4.5 Construções quiméricas: proteína de capsídeo fusionadas a proteínas de envelope

Nos testes iniciais de expressão a construção baseada no antígeno de envelope Ag 2-2 (gp21 + gp46 de HTLV-1) foi expressa na forma insolúvel e com baixo rendimento na recuperação destas proteínas em condição desnaturante, enquanto o antígeno Ag 2-4 (p24 de HTLV-1) foi expresso na forma solúvel e com alto rendimento. Assim planejamos a construção quimérica fusionando proteínas de envelope isoladas a proteína de capsídeo, com o objetivo de obter construções quiméricas solúveis. Clone 2-5 (p24 + gp21 de HTLV-1) e clone 2-7 (p24 + gp46 de HTLV-1)

Para estas construções amplificamos as sequências de DNA que codificam as proteínas gp21 e gp46 por PCR usando como DNA molde o clone 2-2 (pUC57 gp21gp46 de HTLV-1). O produto da PCR foi excisado do gel e purificado pelo kit (Gel extraction Qiagen). O clone 2-4 (pET28a p24 de HTLV-1) foi linearizado pela clivagem com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*, sítio no qual foi ligado os fragmentos isolados e purificados de gp21 e gp46 de HTLV-1, através da ligação catalisada pela enzima T4 DNA ligase (Thermo Scientific).

4.6 Sistema de expressão para os antígenos recombinantes

A cepa de *E. coli* BL21-Star (DE3) (Invitrogen) foi escolhida para expressão das proteínas de HTLV-1 e HTLV-2. Esta cepa contém sequência codificadora da RNA polimerase do *fago T7* inserida no genoma sob o controle do promotor *lac* que pode ser induzido com IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopyranoside). Após a indução a RNA polimerase do T7 vai transcrever o gene do pET28a que está sob o promotor da RNA polimerase de T7. Esta cepa contém também uma mutação no gene *rne* (*rne131*) que codifica a RNase. Com isso a cepa tem baixa capacidade de degradar mRNA resultando num aumento da estabilidade de mRNA Grunberg-Manago (1999).

O plasmídeo para expressão das proteínas recombinantes em *E. coli* escolhido foi pET28a+ (Novagen). Os genes de interesse foram clonados sob o promotor da RNA polimerase T7 sob os sítios *BamHI* e *HindIII* que resultam na expressão de uma sequência de seis histidinas no N-terminal e *NcoI* e *XhoI* com seis histidinas na porção C-terminal das proteínas.

4.7 Expressão das proteínas recombinantes

4.7.1 Crescimento do inóculo

Para expressão das proteínas recombinantes, cepas bacterianas BL21 - Star (DE3) transformadas com o plasmídeo de interesse foram cultivadas em 2,5 ml de meio LB com canamicina (50 μ g/ml) mantidos a 37°C sob agitação de 200 rpm por 16 horas. Ao fim deste período a cultura foi diluída na proporção

1:20 (volume final 50 ml) e meio LB com canamicina (50 µg/ml) e mantida nas condições de crescimento já citadas acima, até a cultura atingir uma densidade óptica entre 0,6 – 0,8 com comprimento de onda de 600 nm. Estes volumes foram adequados aos testes iniciais de expressão das proteínas recombinantes.

Para obtenção de volumes apropriados aos ensaios de purificação, caracterização e imunodiagnóstico foram preparados volumes de cultura de 500 mL nas mesmas proporções aqui descritas. Quando a absorbância D.O.₆₀₀ 0,6 – 0,8 foi atingida, foi adicionado IPTG em uma concentração final de 500 µM, este reagente induz a expressão da proteína de interesse. Para avaliar o efeito da temperatura na expressão solúvel das proteínas de interesse, após a indução por IPTG, a expressão recombinante foi conduzida a 15°C por 16 horas e 25°C por 6 horas, 30°C e 37°C por 4 horas.

4.8 Extração das proteínas recombinantes

4.8.1 Preparação dos extratos por sonicação

A cultura bacteriana foi centrifugada a 6000 x g por 15 minutos a 4°C. O *pellet* de células foi ressuspensionado em solução de 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF e inibidor de protease Roche usando a proporção 3 ml de tampão por grama de células. Após a ressuspensão, foi adicionado lisozima (200 µg/ml) com incubação no gelo por 60 minutos. A lise celular foi realizada em sonificador (6 ciclos em banho de gelo por 15 segundos em amplitude de 30% com intervalos de 1 minuto a cada pulso). Para separação das frações solúvel e insolúvel, o lizado foi centrifugado a 13000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo as proteínas solúveis foi coletado. O *pellet* foi ressuspensionado em Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl. Ambas as frações foram analisadas em gel de poliacrilamida.

4.8.2 Extração de proteínas recombinantes por lise mecânica

Em volumes de expressão em que o extrato atinja volume mínimo de 15 mL (500 mL de cultivo em meio LB) a lise bacteriana pode ser realizada por pressão em microfluidificador.

A cultura bacteriana foi centrifugada a 6000 x g por 15 minutos a 4°C. O pellet de células foi ressuspensionado em solução de lise 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF usando a proporção 3 ml de tampão por grama de células. Após a ressuspensão a lise celular foi através de pressão no equipamento microfluidificador (modelo M-110L, *Microfluidics*) (10 ciclos com pressão de 80000 psi). O extrato foi clarificado por centrifugação (20.000 x g, 30 minutos, 4°C) e o sobrenadante resultante foi transferido para um novo tubo. Para os antígenos expressos de forma solúvel, o sobrenadante foi filtrado e imediatamente aplicado a purificação. Para os antígenos expressos de forma insolúvel, o pellet resultante foi utilizado nas etapas de solubilização.

4.9 Solubilização das proteínas expressas em forma de corpos de inclusão

O *pellet* foi ressuspensionado em Tris HCL pH 8,0; 300 mM NaCl; 2% triton-X100 e sonificado por 6 ciclos em banho de gelo por 15 segundos em amplitude de 30% com intervalos de 1 minuto a cada pulso. Este lavado foi clarificado por centrifugação a 13000 x g por 15 minutos a 4°C. O pellet foi novamente ressuspensionado em Tris HCL pH 8,0; 300 mM NaCl; 2% triton-X100 e o ciclo de lavagem repetido por mais duas vezes. O sobrenadante foi coletado e o pellet ressuspensionado com em Tris HCL pH 8,0; 300 mM NaCl adicionado de 4 M e 8 M de ureia e colocado sob agitação leve por 1 h. Após o período de solubilização centrifugamos a 14000 x g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi coletado onde as proteínas solubilizadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

Para os antígenos Ag 2-2 e Ag 3-1 avaliamos primeiramente a solubilização através de baixas concentrações de agentes desnaturantes pelo protocolo adaptado por Souza (2017).

Para a solubilização das proteínas recombinantes, o pellet obtido da expressão foi ressuspensão em tampão de ressuspensão (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 5%, pH 8,0). Em seguida, foi adicionado lisozima 20 µg/µL e a mistura incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação. Após essa incubação, foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases (PIC, 1 mL para 20 g de pellet (v/p)) e realizada a sonicação por dez vezes com pulsos de 10 segundos e intervalos de mesmo tempo em banho de gelo.

Após a sonicação, foi adicionado Triton-X 100 1% (v/v) e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos sob agitação. Em seguida, foi centrifugada a 8.000 xg por 15 minutos a 10°C e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado com tampão de lavagem (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 1mM, EDTA 0,5 mM, glicerol 5%, Triton X-100 1% pH 8,0) e a amostra centrifugada 8.000 xg por 15 minutos a 10°C. Esse passo de lavagem foi repetido mais 3 vezes.

Em seguida, para remoção de resíduos de Triton-X 100, o pellet foi ressuspensão novamente em tampão de ressuspensão e centrifugado. Essa última etapa foi repetida por 3 vezes. O pellet foi ressuspensão em tampão de desnaturação (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, DTT 5 mM, EDTA 0,5 mM, Glicerol 5%, pH 8,0) para desnaturação dos corpos de inclusão. As amostras foram sonicadas cinco vezes com pulsos de 10 segundos com intervalos de mesmo tempo no gelo entre cada pulso. Em seguida foi adicionado N-Laurilsarcosina (SLS) 30% (v/v) e incubado a temperatura ambiente por 2 horas sob agitação.

4.10 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações dos extratos proteicos e das etapas cromatográficas foram analisados em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e submetidas à eletroforese. O gel de empilhamento (Tris-HCl 0,125 M pH 8,6, SDS 0,1%, acrilamida e bis-acrilamida (30-0,9%), TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,1%) foi preparado com 5% de acrilamida e o gel de separação (Tris-HCl 0,56 M pH 8,8, SDS 0,1%, acrilamida e bis-acrilamida (30-0,8%), TEMED 0,1% e persulfato de amônio 0,1%).

A eletroforese foi realizada em equipamento Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) utilizando tampão de corrida (Tris-Base 25 mmol/L, glicina 250 mmol/L e SDS 0,1%, pH8,3). A amperagem foi mantida constante em 20 mA para cada gel por tempo suficiente para separação das frações proteicas.

As amostras foram preparadas conforme descrito por (Laemmli, 1970), utilizando 5 µl do tampão de amostra 4x para cada caso e aquecidas a 95°C por 5 minutos, com um curto ciclo de centrifugação, o volume total preparado foi aplicado nos géis de poliacrilamida 15% de 0,75mm de espessura e submetidos à eletroforese. Os géis foram corados com azul de Coomassie e descorados em metanol e ácido acético.

4.11 Purificação das proteínas recombinantes

Primeiramente foi realizado um teste de purificação em menor escala em microtubos de 1,5 mL para verificar o comportamento e a capacidade de interação da proteína a ser purificada com a resina selecionada, assim como a necessidade de ajuste na composição dos tampões. Com essas condições estabelecidas passamos então para a etapa de purificação em maior escala no cromatógrafo (Akta Purifier -GE Healthcare Life Sciences).

A técnica utilizada no cromatógrafo foi a de cromatografia de afinidade, visto que as proteínas com sequência e poli-histidinas possuem afinidade ao níquel imobilizado na resina das colunas cromatográficas. Os passos para purificação cromatográfica foram: equilíbrio da coluna com 5 volume de coluna de tampão A; injeção de amostra, lavagem em 10 volumes de coluna, gradiente 1 de 10 – 50 mM de imidazol e gradiente 2 de 50 – 500 mM de imidazol, com fluxo de 1 mL/min e pressão máxima estabelecida em 0,5 MPa. A coleta é feita em frações de 5 mL para as proteínas não ligadas, o passo de lavagem e o gradiente 1 e em frações de 1,0 mL para o gradiente 2.

Tampões utilizados: tampão A: 50 mM Tris HCl; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol; 1 mM PMSF e tampão B: 50 mM Tris HCl; 300 mM NaCl; 500 mM imidazol; 1 mM PMSF.

Para as proteínas solubilizadas em ureia foi adicionado aos tampões A e B a mesma concentração de ureia utilizada para solubilização.

4.12 Ensaios imunológicos por ELISA

4.12.1 Padronização dos ensaios por ELISA

Para a padronização dos testes de ELISA utilizamos o antígeno quimérico Ag 2-5 (p24 + gp21 de HTLV-1). Os ensaios imunoenzimáticos indiretos no formato ELISA foram padronizados de forma a determinar a quantidade ótima dos antígenos de HTLV, bem como a melhor titulação do anticorpo secundário e das amostras séricas.

Em microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo plano (Nunc MaxiSorp®, EUA) foram distribuídos 100 µl da solução tampão carbonato/bicarbonato (50 mM pH 9,6) contendo 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5 ng do antígeno incubado sob refrigeração de 4°C por 16 horas. Após a incubação, os poços foram esvaziados por inversão e efetuada as lavagens com PBS-T (fosfato de sódio 10 mM de Na₃PO₄, cloreto de sódio 150 mM de NaCl e Tween-20 0,05%, pH 7,2) 5 vezes. Como solução de bloqueio foi adicionado 100 µl PBS-T adicionado com 5% de leite em pó desnatado (Molico), as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 1 hora. Ao final da incubação as placas foram lavadas em PBS-T por 5 vezes. Após a lavagem, 100 µl *pool* de soro diluídas foram adicionadas a cada poço.

Para composição das amostras sorológicas foram utilizadas em triplicata amostras séricas formadas por *pool* positivo (8 amostras positivas para HTLV) e *pool* negativos (16 amostras negativas para HTLV) nas diluições de 100 e 200 vezes utilizando o tampão PBS-T, 12 poços sem adição de antígeno (branco) e 12 poços com antígenos adsorvidos, porém sem adição de amostra sérica (controle).

As placas foram seladas e incubadas em estufa a 37°C por 60 min. Ao final deste período as placas foram lavadas cinco vezes com adição de 300 µl de tampão PBS-T. Em seguida, foram adicionados 100 µl do anticorpo secundário diluído em PBS-T em cada cavidade.

O anticorpo secundário (anti-IgG Humano conjugado com peroxidase) produzido pelo LATED (Laboratório de Tecnologia Diagnóstica Biomanguinhos FIOCRUZ-RJ). O anticorpo secundário obtido na diluição estoque 1:1 foi

avaliado nas diluições de 1:20000, 1:40.000 e 1:80.000. As microplacas foram novamente seladas e incubadas em estufa a 37°C por 40 minutos.

Ao final da incubação, as microplacas foram lavadas conforme descrito acima. A cada poço foi adicionado 100 µl do substrato TMB Plus (Ken-Em-Tec Diagnostics A/S, Taastrup, Dinamarca) e, após 10 minutos sob abrigo da luz, foi adicionado 100 µl de H₂SO₄ 1M com objetivo de parar a reação, a absorbância dos poços foi medida no leitor de microplacas (Synergy H1 BioTek Winooski, VT, USA) no comprimento de 450 nm.

Para a interpretação dos dados, os valores de DOs (densidades ópticas) obtidos dos poços denominados branco foram subtraídos das DOs das amostras. Em seguida as médias aritméticas dos valores das DOs das amostras positivas e negativas foram calculadas, bem como os seus respectivos desvios padrão, utilizando o programa Microsoft Excel 2010.

Os critérios estabelecidos para a determinação das condições ótimas basearam-se na maior distância entre a média aritmética das DOs das amostras positivas daquela obtida para as amostras negativas acrescida à três desvios padrão (DP). Além disso, a média aritmética das DOs das amostras positivas deveriam obrigatoriamente ter uma distância numérica de 0,4 das amostras negativas.

Assim os ensaios sorológicos para cada um dos antígenos foram realizados em duplicata utilizando as amostras sorológicas diluídas na proporção 1:100 e o anticorpo secundário (anti-IgG humano) diluído na proporção 1:20000 conforme estabelecido na padronização com o Ag 2-5.

4.12.2 Amostras sorológicas

As amostras sorológicas para padronização dos ensaios foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Dr. Leonardo Foti (Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ-PR) em alíquotas de soros provenientes do painel de Análise Externa da Qualidade (AEQ), elaborado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ/RJ, Brasil) para validação e controle de qualidade dos kits diagnósticos utilizados pela HEMORREDE do Brasil.

O painel AEQ tem como característica soros com alta reatividade aos marcadores das doenças, sendo composto 3 amostras positivas para HTLV, 5 amostras positivas para HTLV e HIV, 1 amostra positiva para HIV e Doença de Chagas, 5 amostras positivas para HBV e HCV, 5 amostras positivas para HIV, e 5 amostras negativas para HTLV, HIV, HCV, HBV e Doença de Chagas.

As amostras sorológicas para validação dos ensaios imunológicos foram gentilmente cedidas pelo Dr. Fred Luciano Neves Santos do Instituto Ageu Magalhães – FIOCRUZ-BA. O conjunto de amostras foi composto por 94 amostras sorológicas positivas provenientes da FIOCRUZ-BA e 94 amostras negativas provenientes do HEMOBA (Centro de Hematologia e Hemoterapia da Bahia).

Para avaliar reatividade cruzada HTLV/HIV utilizamos 15 amostras de soros provenientes do painel de AEQ, elaborado pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS-FIOCRUZ/RJ, Brasil) cedidas pela Dra. Sandra Crestani do Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP-PR).

4.12.3 Análise de dados

Os dados foram codificados e analisados usando o software gráfico GraphPad Prism 6 (San Diego, CA, EUA). A análise do ponto de corte foi usada para estabelecer uma absorbância máxima para distinguir amostras positivas e negativas. O limiar foi definido determinando a maior área sob a curva ROC (receiver operator characteristic). Os dados são apresentados através de gráficos de dispersão e são apresentados em termos do índice de reatividade (IR; isto é, razão entre a absorbância da amostra e linha de corte), com resultados $\geq 1,00$ considerados positivos. Intervalos de confiança (IC) foram calculados para avaliar a precisão desses parâmetros, com intervalo de confiança de 95%.

5. APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

5.1 Análise da variabilidade genética

Uso do alinhamento múltiplo de sequências permitiu estabelecer as relações de similaridade de sequências aminoacídicas entre os antígenos já descritos na literatura. A média de distância p TABELA 4, determina o grau de divergência entre múltiplas sequências de aminoácidos dos antígenos de HTLV-1 onde a variabilidade de sequência aminoacídica entre as sequências pareadas foi inferior a 7%.

A análise inicial da variabilidade genética dos antígenos avaliada por BlastP das proteínas de HTLV contra o banco de dados de sequências do Genbank não mostram *hits* significativos com outros retrovírus, indicando que o uso dessas proteínas em testes sorológicos deve ser específico para HTLV.

TABELA 4: GRAU DE VARIABILIDADE DE MÚLTIPLAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ENTRE PROTEÍNAS DE HTLV-1

PROTEÍNAS	SEQUÊNCIAS PAREADAS	MÉDIA DE DISTÂNCIA (P)
p19 HTLV-1	147	3,1 %
gp21 HTLV-1	161	2,6 %
gp46 HTLV-1	356	6,1 %
p24 HTLV-1	197	0,9 %

Fonte: O autor.

Analisando a variabilidade para os antígenos p24 e gp21+gp46 (env) de HTLV-2 na TABELA 5 verificamos que estas proteínas são bastante conservadas com base na média de distância p .

TABELA 5: GRAU DE VARIABILIDADE DE MÚLTIPLAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS ENTRE PROTEÍNAS DE HTLV-2

Proteínas	Sequências pareadas	Média de distância (p)
Gag HTLV-2	17	0,9 %
Env HTLV-2	72	1,0 %

Fonte: O autor.

A comparação da conservação das proteínas entre os dois tipos de HTLV mostra uma grande similaridade para todas as proteínas demonstrado na TABELA 6, indicando que possivelmente os testes imunodiagnósticos baseados nestas proteínas podem não ser específicos para a genotipagem entre HTLV-1 e 2.

TABELA 6: CONSERVAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS DAS DIFERENTES PROTEÍNAS DO HTLV ENTRE OS TIPOS HTLV-1 E HTLV-2.

Proteínas	Identidade	Similaridade
<i>Env</i>	69%	84%
<i>p24</i>	83%	90%
<i>p19</i>	55%	72%

Fonte: O autor.

5.2 Definição das construções genéticas para expressão dos antígenos de HTLV-1 e 2

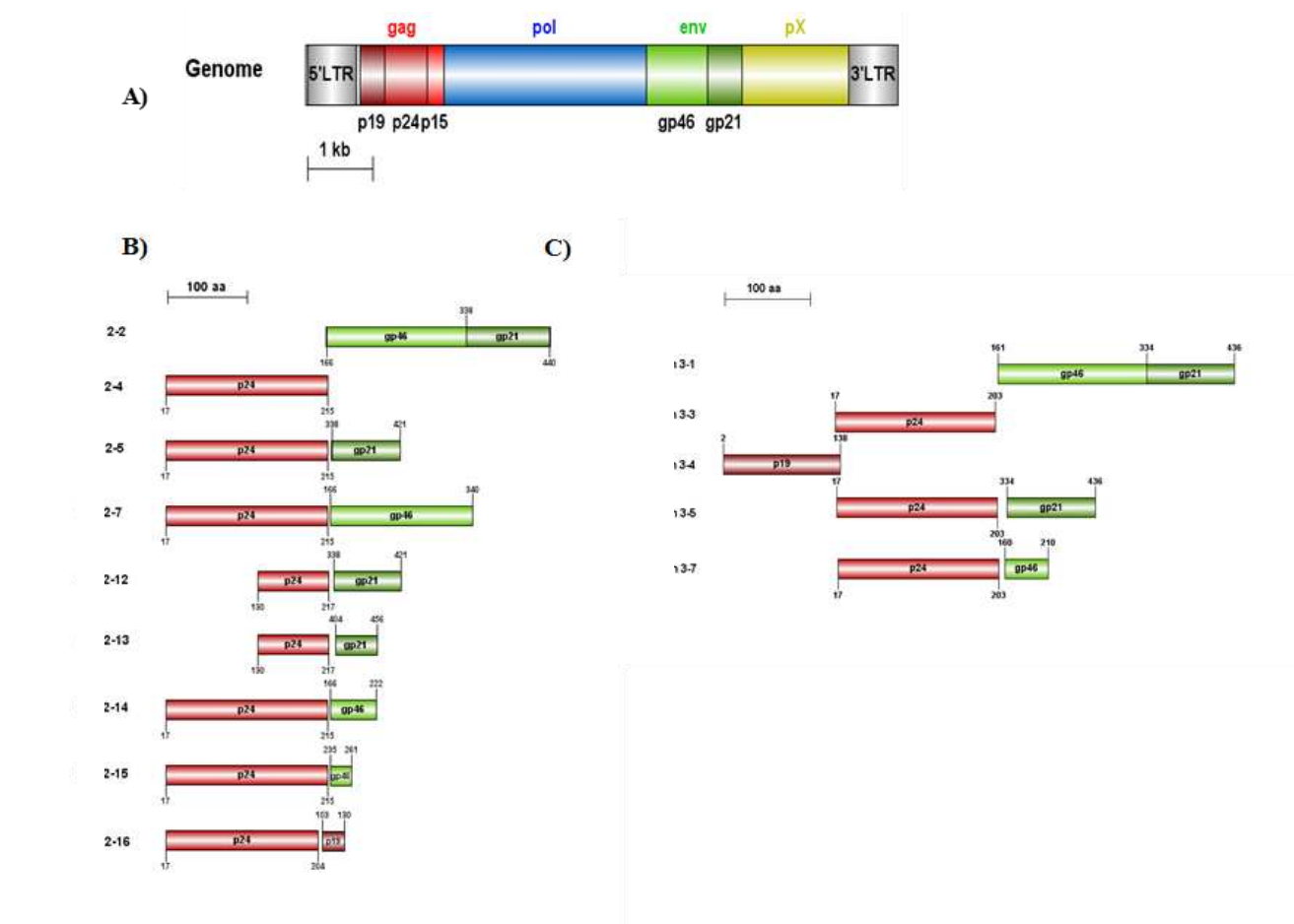
Inicialmente determinamos as construções antigênicas denominados Ag 2-2 (Env de HTLV-1), Ag 2-4 (p24 de HTLV-1), Ag 3-1 (Env de HTLV-2) e Ag 3-3 (p24 de HTLV-2) descritas nas TABELAS 2 e 3. Entretanto devido ao baixo rendimento de proteínas de envelope solubilizadas em condição desnaturante, planejamos as construções quiméricas destas proteínas de envelope fusionadas a proteína de capsídeo, as construções correspondem aos Ag 2-5 (p24+gp21 de HTLV-1) e Ag 2-7 (p24+gp46 de HTLV-1). Diferentemente do resultado esperado as construções quiméricas Ag 2-5 e Ag 2-7 foram expressas de forma insolúvel e apresentando o mesmo grau de dificuldade na recuperação da solubilidade e reprodutibilidade dos métodos de solubilização.

Assim definimos novas construções antigênicas priorizando as regiões imunogênicas das proteínas de envelope em fusão com a proteína de capsídeo

p24 inteira e em uma construção truncada (apenas domínio C terminal) além de construções correspondentes a proteína de matriz p19 de HTLV-1 e 2.

As construções antigênicas de HTLV-1 e 2 foram definidas a partir de regiões imunogênicas descritas na literatura. A FIGURA 6 apresenta o esquema em que as construções antigênicas foram desenvolvidas.

FIGURA 6: ESQUEMA DAS CONSTRUÇÕES ANTIGÊNICAS DESENVOLVIDAS



Legenda: A) Representação esquemática do genoma do vírus HTLV-1 e 2; B) Esquema das construções antigênicas das proteínas recombinantes de HTLV-1; C) Esquema das construções antigênicas das proteínas recombinantes de HTLV-2.

Fonte: Adaptado de Barreto et al. (2017 e Ren et al. (2009)

5.3 Sequências de aminoácidos dos clones usados para expressão dos antígenos de HTLV-1

A construção quimérica Ag 2-2 baseada no gene *env* de HTLV-1 foi definida a partir do antígeno comercial *HTLV-1 Mosaic* (Jena Biociences GmbH

- Thuringia, Germany). O antígeno Ag 2-2 compreende os aminoácidos 166 a 440 correspondente a região gênica *env* de HTLV-1 a FIGURA 7 esquematiza a sequência de aminoácidos e as regiões de domínio das proteínas gp46 e gp21 de HTLV-1.

FIGURA 7: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-2

VDAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLSHSNLDHILEPSIPWKSLLT
LVQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSVSPSSTPLLYPSLA
LPAPHLTPFNWTHCFDPQIQAISSPCHNSLILPPFSLSPVPTLGSR
RRAPVAVWLVSALAMGAGVAGRITGSMSLASGKSLHEVDKDIS
QLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKALQEQC
CFLNITNSHVSILQERPPLENRVLTGWGLNWDLGLSQWAR

Legenda: Verde claro: aminoácidos de 166 a 338 de gp46 de HTLV-1; preto sublinhado: *linker* composto por uma glicina e uma serina; verde escuro: aminoácidos de 338 a 440 de gp21 de HTLV-1.

O antígeno Ag 2-4 foi produzido em forma de proteína única da região do gene *gag* que corresponde a proteína de capsídeo p24 de HTLV-1. A utilização deste antígeno se baseia no trabalho de HORAL et al., (1991) no qual foi demonstrado que anticorpos contra esta proteína surgem precocemente após a infecção por HTLV-1. O clone contém a região que codifica os aminoácidos 17 a 217 do domínio *gag* destacados em vermelho na FIGURA 8.

FIGURA 8: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DOS ANTÍGENO AG 2-4

MASMKDLQAIKQEVSSQAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQDLL
QYLCSSLVASLHHQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQQQ
GLRREYQQLWLAAFAALPGSAKDPSWASILQGLEEYPYHAFVERLNIAL
DNGLPEGTPKDPILRSLAYSNANKECQKLLQARGHTNSPLGDMRLAC
QGGSSCAA

Legenda: A sequência correspondente a proteína p24 de HTLV-1

O antígeno Ag 2-5 foi obtido a partir da proteína p24 de HTLV-1 em fusão com gp21 de HTLV-1. Este antígeno compreende os aminoácidos de 17 a 215 de p24 de HTLV-1 e os aminoácidos 338 a 421 de gp21 de HTLV-1 isolados da

construção Ag 2-2. A FIGURA 9 apresenta a sequência da construção quimérica do antígeno Ag 2-5.

FIGURA 9: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-5

MAGSASMKDLQAIKQEVSSQAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQ
DLLQYLCSSLVASLHHQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQ
QQGLRREYQQLWLAAFAALPGSAKDPSWASILQGLEEPYHAFVERLNI
ALDNGLPEGTPKDPILRSLAYSANANKECQKLLQARGHTNSPLGDMMLRA
CQGGSSMSLASGKSLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRR
GLDLLFWEQGGLCKALQECCFLNITNSHVSILQERPPLEN

Legenda: A sequência correspondente a proteína p24 de HTLV-1 compreende os aminoácidos 17 a 215 destacados em vermelho, a região destacada em verde escuro corresponde aos aminoácidos 338 a 421 da proteína gp21 de HTLV-1.

O antígeno Ag 2-7 foi obtido a partir da fusão da proteína p24 de HTLV-1 com gp46 de HTLV-1. Assim como Ag 2-5, a sequência correspondente a proteína gp46 foi isolada da construção Ag 2-2. A FIGURA 10 apresenta a sequência de aminoácidos desta quimera.

FIGURA 10: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-7

MAGSASMKDLQAIKQEVSSQAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQ
DLLQYLCSSLVASLHHQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQ
QQGLRREYQQLWLAAFAALPGSAKDPSWASILQGLEEPYHAFVERLNI
ALDNGLPEGTPKDPILRSLAYSANANKECQKLLQARGHTNSPLGDMMLRA
CQGGSSVDAPGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLSHSNLDHILEPSIPWK
SKLLTLVQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSVSPSPSTPLLYPS
LALPAPHLTLPFNWTHCFDPQIQAIWSSPCHNSLILPPFSLSPVPTLGSRS
RRAVPVAVWLVSALAMGAGVAGRITGS

Legenda: Vermelho: sequência de aminoácidos de 17 a 215 correspondente a p24 de HTLV-1; preto sublinhado: *linker* composto por duas glicinas e duas serinas; verde claro: aminoácidos de 166 a 340 da proteína gp46 de HTLV-1.

O antígeno quimérico Ag 2-12 foi produzido a partir da fusão da proteína de envelope gp21 de HTLV-1 ao domínio C terminal da proteína de capsídeo p24 de HTLV-1. A FIGURA 11 apresenta a sequência de aminoácidos desta quimera.

FIGURA 11: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-12

MAKDPSWASILQGLEEPYHAFVERLNIALDNGLPKDPILRSLAYSNA
NKECQKLLQARGHTNSPLGDMRLACQWTWPKDKTKALGGSAMSLASGK
SLLHEVDKDISQLTQAIVKNHKNLLKIAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGLCK
ALQECCFLNITNSHVSILQERPPLEN

Legenda: Vermelho: Os aminoácidos 130 a 217 compreendem ao domínio C terminal da proteína p24 de HTLV-1; preto sublinhado: *linker* espaçador composto por duas glicinas e uma serina; verde escuro: Os aminoácidos de 338 a 421 da proteína gp21 de HTLV-1.

Semelhante ao antígeno quimérico Ag 2-12, a construção Ag 2-13 também se baseou na quimera p24 + gp21 de HTLV-1 presente também no antígeno Ag 2-5. Entretanto, o domínio correspondente à proteína gp21 contém apenas a região da lisina 404 ao C terminal da proteína. Esta região foi descrita como imunogênica no trabalho de Hernández Marin, M et al. (2001). A FIGURA 12 apresenta a sequência de aminoácidos do antígeno Ag 2-13.

Figura 12: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-13

MAKDPSWASILQGLEEPYHAFVERLNIALDNGLPKDPILRSLAYS
NANKECQKLLQARGHTNSPLGDMRLACQWTWPKDKTKALGGSKIAQ
YAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKALQECCFLNITNSHVSILQERPPLEN

Legenda: Vermelho: Compreende os aminoácidos de 130 a 217 da proteína p24 de HTLV-1; preto sublinhado: *linker* espaçador composto por duas glicinas e uma serina; verde escuro: Os aminoácidos de 404 ao 456 da proteína gp21 de HTLV-1.

O antígeno quimérico Ag 2-14 baseia-se na construção quimérica p24 + gp46 presente também na construção Ag 2-7, o que difere esta construção é a sequência aminoacídica correspondente a proteína gp46. Nesta construção a região imunogênica de gp46 compreende os aminoácidos de 162 a 222, a qual corresponde à região imunogênica a identificada por Hernández Marin, M et al.

(2001 e Horal et al. (1991). A FIGURA 13 apresenta a sequência de aminoácidos desta quimera.

FIGURA 13: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-14

MASMKDLQAIKQEVSAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQDLL
QYLCSSSLVASLHHQQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQQQ
GLRREYQQLWLAAFAALPGSAKDPSWASILQGLEEYPYHAFVERLNIAL
DNGLPEGTPKDPILRSLAYSNANKECQKLLQARGHTNSPLGDMLRAC
QWTPKDKTKALGGSLLVDPAGYDPIWFLNTEPSQLPPTAPPLLPHSN
LDHILEPSIPWWSKLLTLVQLTLQSTN

Legenda: Vermelho: Compreende os aminoácidos 130 a 217 do domínio C terminal da proteína p24 de HTLV-1; preto sublinhado: *linker* espaçador composto por duas glicinas e uma serina; verde claro: aminoácidos de 166 ao 222 pertencentes a proteína gp46 de HTLV-1.

Assim como Ag 2-7 e Ag 2-14, o antígeno quimérico Ag 2-15 também se baseou na construção p24 de HTLV-1 em fusão com gp46 de HTLV-1. Diferente das construções 2-7 e 2-14 esta quimera se sobrepõe à região imunogênica de gp46 de HTLV-1 descrita por Horal et al. (1991). Os aminoácidos desta construção compreendem do 235 ao 261 de gp46 de HTLV-1. A FIGURA 14 demonstra a sequência de aminoácidos desta quimera.

FIGURA 14: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-15

MASMKDLQAIKQEVSAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDLQDLL
QYLCSSSLVASLHHQQQLDSLISEAETRGITGYNPLAGPLRVQANNPQQQ
GLRREYQQLWLAAFAALPGSAKDPSWSILQGLEEYPYHAFVERLNIALD
NGLPEGTPKDPILRSLAYSNANKECQKLLQARGHTNSPLGDMLRACQT
WTPKDKTKALGGSTWHVLYSPNVSVPSSTPLFYPSLA

Legenda: Vermelho: aminoácidos 130 a 217 do domínio C terminal da proteína p24 de HTLV-1; preto sublinhado: *linker* espaçador composto por duas glicinas e uma serina; verde claro: aminoácidos de 235 ao 261 da proteína gp46 de HTLV-1.

O antígeno Ag 2-16 foi produzido a partir da fusão da proteína p24 de capsídeo a parte da proteína p19 de matriz de HTLV-1. Para esta construção utilizamos a proteína p24 entre os aminoácidos 17 ao 217 e a proteína p19 entre os aminoácidos 100 e 130. Esta região foi avaliada no trabalho de Faramarzi; Dolatabadi (2017). Entre as regiões imunogênicas p24 e p19

inserimos duas glicinas e uma serina como *linker* de flexibilidade (GGS). A FIGURA 15 descreve a sequência de aminoácidos desta quimera.

FIGURA 15: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 2-16

MAGSMKDLQAIKQEVSSAPGSPQFMQTLRLAVQQFDPTAKDLQ
DLLQYLCSSLVSLHHQQLNTLITEAETRGVTGYNPMAGPLRMQA
NNPAQQGLRREYQNLWLAAFSTLPGNTRDPSWAAILQGLEEYCA
FVERLNVALDNGLPETGPKPILRSLAYSANKECQKILQARGHTNS
PLGEMLRACQAGGSLSLASSKSLFEVDKDISHLTQAIVKNHQNILR
VAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKAIQECCFLNISNTHVSVLQE
RPPEKRVITGWGLNWDLGLSQWAR

Legenda: Vermelho: Aminoácidos 130 a 217 do domínio C terminal da proteína p24 de HTLV-1; preto sublinhado: linker espaçador composto por duas glicinas e uma serina; bordô: Aminoácidos de 103 ao 130 da proteína p19 de HTLV-1.

5.4 Sequências de aminoácidos dos antígenos de HTLV-2

O antígeno quimérico Ag 3-1 foi produzido a partir das regiões gp21 e gp46 do gene *env* de HTLV-2. Seguindo o arcabouço de Ag 2-2, o antígeno quimérico Ag 3-1 foi definido entre os aminoácidos 161 e 436. As regiões imunodominantes correspondentes a gp21 e gp46 de HTLV-2 foram espaçadas com a inserção de um *linker* composto por uma glicina e uma serina (GS). Esta construção contempla as regiões imunogênicas descritas por Faramarzi; Dolatabadi (2017 e Hernández Marin et al. (2003 e Hernández Marin, M et al. (2001 e Horal et al. (1991). A FIGURA 16 descreve a sequência de aminoácidos deste antígeno.

FIGURA 16: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-1

VDAPGYDPLWFITSEPTQPPPTPPPLVHDSLEHVLTPSTSWTTKMLKF
IQLTLQSTNYSCMVCVDRSSLSSWHVLYTPNISIPQQTSSRTLFPSLALP
APPFQFPWTHCYQPRQLAITTDNCNNSIILPPFSLAPVPPPATRRRRA
VPIAVWVFVSALAAGTGIAGGVTGSLSLASSKSLFEVDKDISHLTQAIVK
NHQNILRVAQYAAQNRRGLDLLFWEQGGLCKAIQECCFLNISNTHV
SVLQERPPLEKRVITGWGLNWDLGLSQWAR

Legenda: Verde claro: Aminoácidos da região entre 161 a 334 de gp46 de HTLV-2; preto sublinhado: *linker* espaçador; verde escuro: Aminoácidos da região entre 334 a 436 de gp21 de HTLV-2.

O antígeno Ag 3-3 é corresponde a proteína de capsídeo p24 de HTLV-2. A construção foi produzida em forma de proteína única contendo os aminoácidos de 17 a 203. A FIGURA 17 descreve a sequência de aminoácidos deste antígeno.

FIGURA 17: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-3

MKDLQAIKQEVSSAPGSPQFMQTLRLAVQQFDPTAKDLQDLLQYLCS
SLVVSLHHQQLNTLITEAETRGTGYNPMAGPLRMQANNPAQQGLRR
EYQNLWLAAFASTLPGNTRDPSWAAILQGLEEPYCAFVERLNVALDNGLP
EGTPKEPILRSLAYSNANKECQKILQARGHTNSPLGEMLRACQA

Legenda: A sequência correspondente a proteína p24 de HTLV-2.

A sequência de aminoácidos do antígeno Ag 3-4 foi determinada com base na estrutura tridimensional (PDB: 1JRV), que corresponde a proteína de matriz p19 de HTLV-2. Esta construção foi definida contendo os aminoácidos de 02 ao 138, com adição de 10 histidinas à porção N terminal e a substituição de duas cisteínas nas posições 108 e 137 por serinas. A FIGURA 18 apresenta a sequência de aminoácidos da proteína Ag 3-4.

FIGURA 18: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO Ag 3-4

MGHHHHHHHHHHSSGHMGQIHGLSPTPIPKAPRGLST
HHWLNFLQAAYRLQPGPSDFDFQQLRRFLKLALKTPIW
LNPIDYSLLASLIPKGYPGRVVEIINILVKNQVSPSAPAAP
VPTPI**S**PTTT**P**PPPP**P**SP**E**AHVPPPYVEPTTT**Q****S**F

Legenda: Cinza claro: 10 histidinas inseridas na porção N terminal; bordô: aminoácidos de 2 a 138 baseados em 1JRV; azul claro: serinas em substituição a cisteínas.

O antígeno Ag 3-5 de HTLV-2 foi definido com base nas construções 2-5, 2-12 e 2-13 de HTLV-1, as quais consistem em construções quiméricas a partir da fusão de p24 com gp21 de HTLV-2. Ag 3-5 contempla a região

imunodominante de 17 a 203 de p24 de HTLV-2 separada por um *linker* de GGS em fusão com os aminoácidos 314 a 436 de gp21. Esta região de gp21 se sobrepõe aos epítomos descritos por Horal et al. (1991) e também está presente nos peptídeos avaliados por Hernández Marin, Milenen et al. (2001). A FIGURA 19 descreve a sequência de aminoácidos desta proteína.

FIGURA 19: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-5

MAGSMKDLQAIKQEVSSSAPGSPQFMQTLRLAVQQFDPTAKDLQDL
 LQYLCSSLVSLHHQQLNTLITEAETRGVTGYNPMAGPLRMQANNPA
 QQGLRREYQNLWLAASFSTLPGNTRDPSWAAILQGLEEPYCAFVERLN
 VALDNGLPEGTPKEPILRSLAYSNANKECQKILQARGHTNSPLGEMLR
 CQAGGSLSLASSKSLLFEVDKDISHLTQAIVKNHQNILRVAQYAAQNRR
 GLDLLFWEQGGLCKAIQECCFLNISNTHVSVLQERPPLEKRVITGWG
 LNWDLGLSQWAR

Legenda: Vermelho: Sequência de aminoácidos de 17 a 203 da proteína p24 de HTLV-2; preto sublinhado: *linker* composto por duas glicinas e serina; verde escuro: Sequência de aminoácidos entre 334 a 436 da proteína gp21 de HTLV-2

O antígeno Ag 3-7 de HTLV-2 foi baseado na construção quimérica p24 + gp46 presente nas construções 2-7, 2-14 e 2-15 de HTLV-1. A região imunodominante de gp46 compreende os aminoácidos de 160 a 210. Esta região se sobrepõe as regiões imunogênicas identificadas por Hernández Marin et al. (2003). A FIGURA 20 descreve a sequência de aminoácidos deste antígeno quimérico.

FIGURA 20: SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DO ANTÍGENO AG 3-7

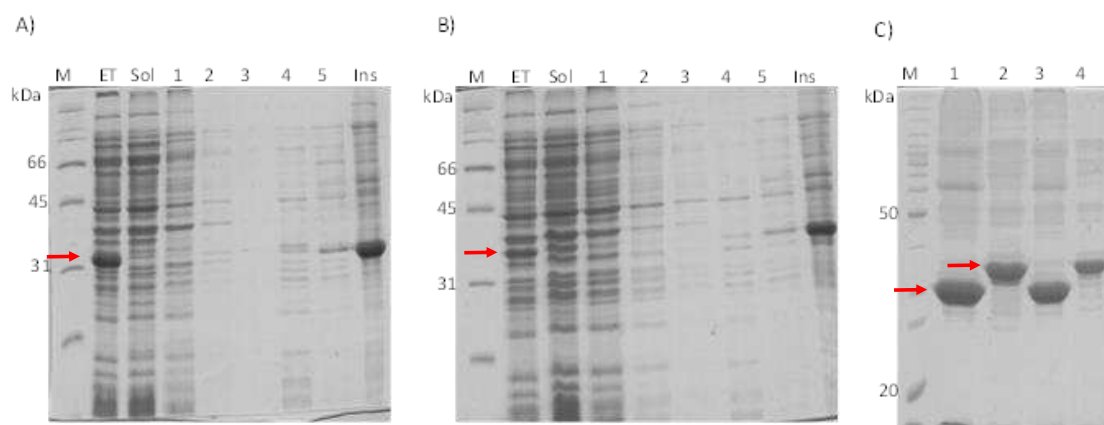
MAGSMKDLQAIKQEVSSSAPGSPQFMQTLRLAVQQFDPTAKDLQDL
 LQYLCSSLVSLHHQQLNTLITEAETRGVTGYNPMAGPLRMQANNPA
 QQGLRREYQNLWLAASFSTLPGNTRDPSWAAILQGLEEPYCAFVERLN
 VALDNGLPEGTPKEPILRSLAYSNANKECQKILQARGHTNSPLGEMLR
 CQAGGSDAPGYDPLWFITSEPTQPPPTPPPLVHDSLEHVLTPTSWT
 TKMLK

Legenda: Vermelho: região de 17 a 203 de p24 de HTLV-2; preto sublinhado: *linker* composto por duas glicinas e uma serina; verde claro: região de 160 a 210 de gp46 de HTLV-2.

5.5 Expressão e solubilização dos antígenos baseados nas proteínas de envelope Ag 2-2 de HTLV-1 e Ag 3-1 de HTLV-2

Os antígenos baseados em proteínas de envelope de HTLV Ag 2-2 de HTLV-1 e Ag 3-1 de HTLV-2 foram expressos na forma insolúvel. Primeiramente avaliamos o protocolo adaptado de SOUZA, (2017), entretanto não obtivemos êxito na solubilização, conforme demonstrado na FIGURA 21 A para o antígeno Ag 2-2 e a FIGURA 21-B para o antígeno Ag 3-1. A solubilização parcial destes antígenos foi alcançada ressuspensando os pellets em tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 4 M de ureia e incubação com leve agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução foi centrifugada à 14000 xg por 15 minutos a 4°C. A FIGURA 21-C demonstra as frações solubilizadas dos antígenos Ag 2-2 e Ag 3-1 obtidas nesta condição.

FIGURA 21: ANÁLISE EM GEL DE POLIACRILAMIDA DA SOLUBILIZAÇÃO DOS ANTÍGENOS AG 2-2 E AG 3-1

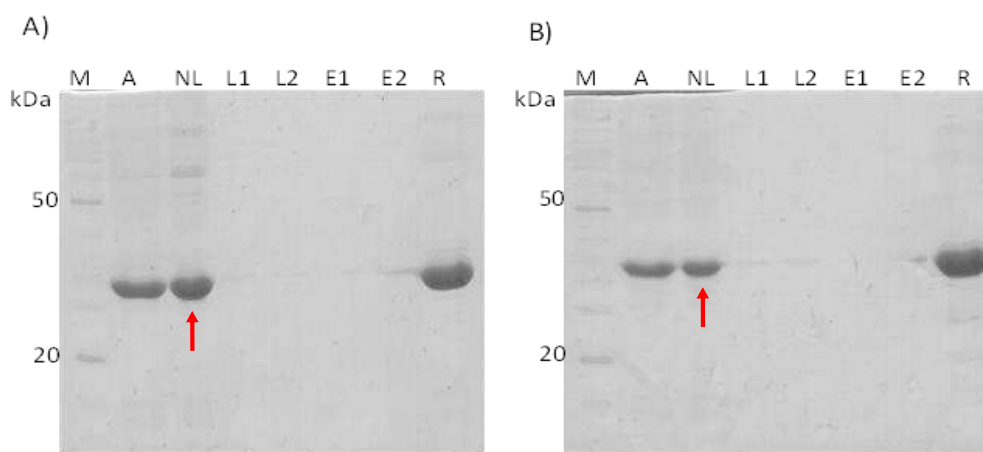


Legenda: Análise dos antígenos Ag 2-2 e Ag 3-1 solubilizados dos corpos em de poliácridamida 15% M) Marcador de peso molecular; A) Proteína de envelope gp21gp46 de HTLV-1; ET- Extrato de proteínas após lise; Sol: Fração solúvel após lise e clarificação; Frações de 1 – 5 lavagens; Ins: fração insolúvel obtida após última etapa de lavagem. B) Proteína de envelope gp21gp46 de HTLV-2, ET- Extrato de proteínas após lise; Sol: Fração solúvel após lise e clarificação; Frações de 1 – 5 lavagens; Ins: fração insolúvel obtida na última etapa de lavagem. C) Solubilização. Frações 1 e 2 proteínas de envelope gp21 + gp46 de HTLV-1 e HTLV-2 respectivamente solubilizadas a partir da adição de 4 M de ureia; Frações 3 e 4 insolúvel após centrifugação.

5.6 Purificação dos antígenos de envelope Ag 2-2 de HTLV-1 e Ag 3-1 de HTLV-2

A purificação por afinidade dos antígenos Ag 2-2 e Ag 3-1 utilizando a resina de níquel, conforme mostram as FIGURAS 22 A e B, a maior parte das proteínas não interagem com a resina, e a quantidade que se ligou a resina não eluiu mesmo após a adição de tampão 50 mM Tris HCl; 300 mM NaCl e 500 mM de imidazol. Entretanto a fração destes antígenos que não ligaram à resina permaneceram solúveis e com grau de pureza satisfatório para a realização de teste imunológicos por ELISA.

FIGURA 22: ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE ENVELOPE VIRAL AG 2-2 DE HTLV-1 E AG 3-1 DE HTLV-2 EM RESINA DE NÍQUEL



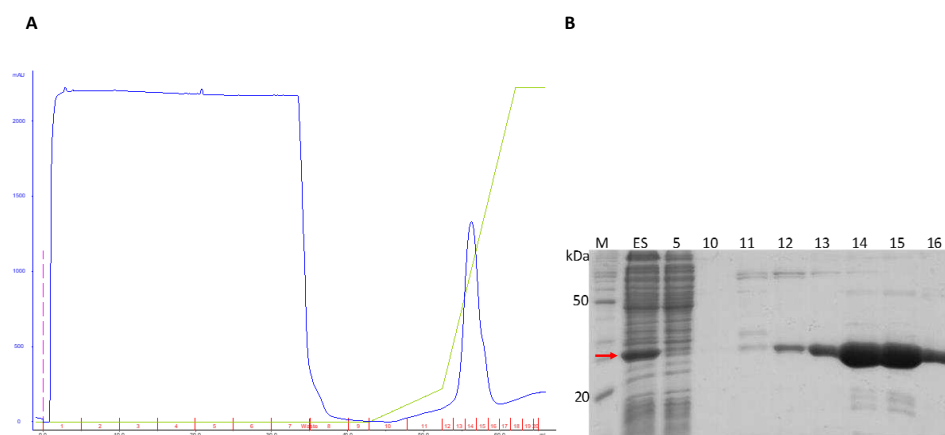
Legenda: A) Avaliação da purificação em resina de níquel, do antígeno Ag 2-2 de HTLV-1; A- Amostra aplicada a resina; NL: fração não ligada a resina; L1 e L2 sucessivas etapas de lavagem; E1 e E2 frações eluídas a partir da adição e tampão B; R- Resina de Níquel após etapas de purificação. B) Antígeno Ag 3-1 de HTLV-2; A- Amostra aplicada a resina; NL: fração não ligada a resina; L1 e L2 sucessivas etapas de lavagem; E1 e E2 frações eluídas a partir da adição e tampão B; R- Resina de níquel após etapas de purificação.

5.7 Análise da purificação por afinidade do antígeno Ag 2-4 de HTLV-1

O antígeno Ag 2-4 (p24 de HTLV-1) foi expresso a 37°C por 4 horas na forma solúvel podendo assim ser imediatamente purificado por afinidade a resina de níquel.

O antígeno Ag 2-4 pode ser purificado com êxito em uma única etapa de purificação. Na FIGURA 23-A, analisamos o gradiente de eluição em relação ao sinal de absorbância, a partir da adição de 20% de tampão B (50 mM Tris HCl; 300 mM NaCl; 100 mM de imidazol) temos o início da eluição da proteína p24, observamos um pico de eluição que se estende entre as frações 12 a 18. Analisando a FIGURA 23-B, a seta vermelha indica a banda com massa molecular referente a proteína p24 de HTLV-1 de aproximadamente 25 kDa. Na fração ES da mesma figura observamos o rendimento de expressão solúvel desse antígeno. Nas frações 13 a 16 correspondentes ao pico de eluição confirmamos a presença da proteína de aproximadamente 25 kDa obtida com grau de pureza e rendimento satisfatório para aplicação em ensaios imunológicos. As frações de 14 e 15 foram reunidas, quantificadas e diluídas para a concentração final de 2 mg/mL.

FIGURA 23: ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-4 (P24 DE HTLV-1)



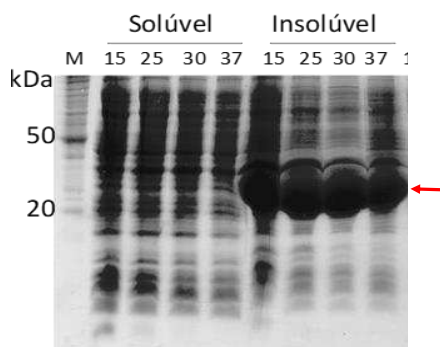
Legenda: Avaliação de purificação por afinidade do antígeno Ag 2-4. A: Cromatograma gerado a partir do gradiente de purificação por afinidade. Linha azul: absorbância a 280 nm; linha verde: gradiente de imidazol (tampão B). B: Análise em gel de poliacrilamida 15%; M: marcador de massa molecular; ES: Amostra aplicada a purificação (extrato solúvel); 5: fração correspondente as amostras não ligadas a coluna; 10: fração correspondente a etapa de lavagem da coluna; 11: fração correspondente ao gradiente 1 de eluição; 12 a 16 frações correspondentes ao gradiente 2 de eluição.

5.8 Expressão, solubilização e purificação do antígeno Ag 2-5

5.8.1 Teste de expressão: Avaliação de solubilidade do antígeno Ag 2-5

O antígeno Ag 2-5 foi planejado com base na solubilidade da proteína p24 de HTLV-1. Como ela é bastante solúvel, esperava-se que auxiliaria na solubilização da porção de gp21. A expressão desta quimera foi testada nas temperaturas de 15°C e por 16 horas, 25 por 6 horas e 30°C e 37°C por 4 horas. Entretanto, ao avaliarmos a expressão desta quimera na FIGURA 24 observamos que não obtivemos proteína correspondente ao Antígeno Ag 2-5 expressa na forma solúvel em nenhuma das temperaturas testadas na expressão. Embora não realizada a quantificação das frações, a análise visual do gel de poliacrilamida nos mostra que a variação de temperatura não influenciou no rendimento de expressão deste antígeno.

FIGURA 24: AVALIAÇÃO DE SOLUBILIDADE EM RELAÇÃO A TEMPERATURA DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO AG 2-5



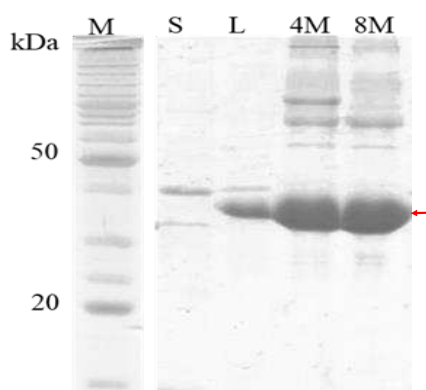
Legenda: Análise em gel de poliacrilamida 15%. M: Marcador de massa molecular; a seta vermelha indica bandas correspondente ao antígeno Ag 2-5 de aproximadamente 35 kDa.

5.8.2 Ensaio de solubilização do antígeno Ag 2-5

A avaliação da solubilização do antígeno Ag 2-5 expresso a 30°C por 4 horas foi realizada ressuspensando o *pellet* resultante da lise em tampão de lavagem Tris HCL pH 8,0; 300 mM NaCl; 2% triton-X100 e sonicação conforme descrito na metodologia. As condições de solubilização avaliadas foram com incubação em tampão Tris HCL pH 8,0; 300 mM de NaCl adicionado de 4 M e 8 M de ureia. Alíquotas correspondentes as etapas de expressão, lise, lavagem e solubilização foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida.

A partir da etapa de lavagem, fração L da FIGURA 25, foi possível obter o antígeno Ag 2-5 solúvel, mas com baixo rendimento em relação a amostra desnaturada em tampão 50 mM tris HCl pH 8; 300 mM NaCl; 4 M e 8 M de ureia, portanto optamos por utilizar a fração desnaturada em tampão contendo 4M de ureia para avaliar a purificação por afinidade em resina de níquel deste antígeno.

FIGURA 25: ANÁLISE DO ENSAIO DE SOLUBILIZAÇÃO POR DESNATURAÇÃO DO ANTÍGENO AG 2-5



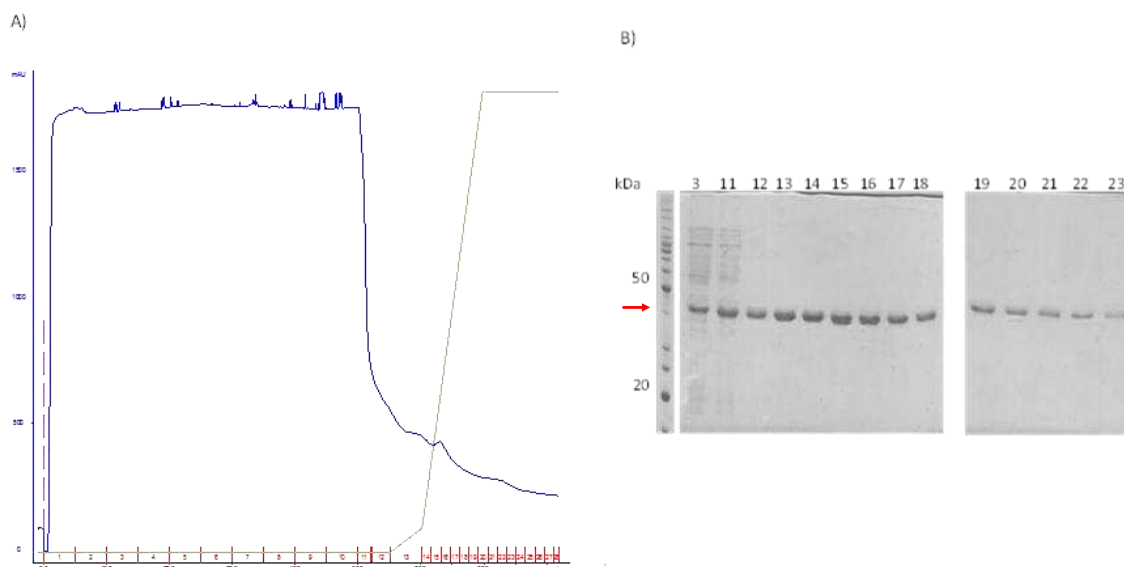
Legenda: Análise em gel de poliacrilamida 15% da solubilização do antígeno Ag 2-5. M: Marcador de peso molecular; S: corresponde a fração solúvel após a clarificação; L: corresponde a etapa de lavagem; 4M: corresponde a fração solubilizada com adição de 4M de ureia ao tampão; 8M: corresponde a fração solubilizada com adição de 8M de ureia ao tampão.

5.8.3 Purificação por afinidade em resina de níquel do antígeno Ag 2-5

A purificação por afinidade ao níquel do antígeno quimérico Ag 2-5 (p24 + gp21 de HTLV-1) foi realizada em gradiente de imidazol. A coluna de níquel (Histrap HP GE de 1 mL) foi equilibrada em tampão A composto de 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 4 M de ureia. Após a injeção a coluna foi lavada com 5 mL de tampão A em seguida foi lavada com adição gradual de 0 a 10% de tampão B (50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 4 M ureia; 500 mM imidazol). A eluição foi realizada em gradiente linear de 10 mL de 10 a 100% de tampão B. Analisando as frações 3 e 11 da FIGURA 25 - B observamos que o antígeno Ag 2-5 está presente nas frações correspondentes as proteínas não ligadas a resina. Entretanto como pode ser observado na mesma figura entre as frações

12 a 23 temos a presença da proteína com grau de pureza satisfatório para a realização de ensaios imunológicos por ELISA. Estas frações, foram juntadas e concentradas para 2 mg/mL.

FIGURA 26: ANÁLISE DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-5



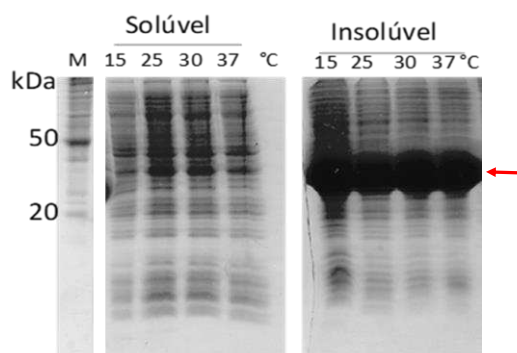
Legenda: Avaliação de purificação por afinidade do antígeno Ag 2-5. A: Cromatograma gerado a partir do gradiente de purificação por afinidade. Linha azul: absorbância a 280 nm; linha verde: gradiente de imidazol (tampão B). B: Análise em gel de poliacrilamida 15%; M: marcador de massa molecular; 3 e 11: fração correspondente as amostras não ligadas a resina; 12 a 23 frações correspondentes ao gradiente de eluição.

5.9 Expressão, solubilização e purificação do antígeno Ag 2-7 (p24 + gp46 de HTLV-1)

5.9.1 Teste de expressão: Avaliação de solubilidade do antígeno Ag 2-7

Assim como a proteína quimérica Ag2-5, o antígeno quimérico Ag 2-7 foi planejado considerando a solubilidade da proteína p24 de HTLV-1, a qual poderia auxiliar na solubilidade da porção do antígeno gp46. A expressão deste antígeno foi avaliada nas temperaturas de 15°C e por 16 horas, 25°C por 6 horas e 30°C e 37°C por 4 horas. Entretanto, ao avaliarmos a expressão deste antígeno observamos que não obtivemos proteína correspondente ao antígeno Ag 2-7 solúvel em nenhuma das temperaturas testadas. Uma análise visual do gel de poliacrilamida na FIGURA 27 nos mostra que a variação de temperatura não influenciou no rendimento de expressão deste antígeno.

FIGURA 27: AVALIAÇÃO DE SOLUBILIDADE EM RELAÇÃO A TEMPERATURA DE EXPRESSÃO DO ANTÍGENO AG 2-7

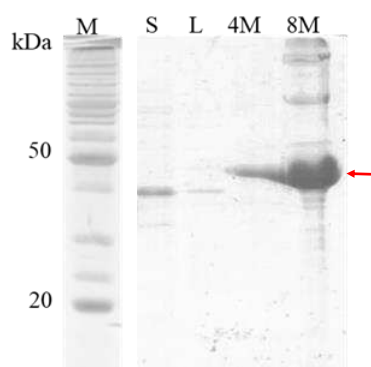


Legenda: Análise em gel de poliacrilamida 15%. M: Marcador de massa molecular; seta vermelha indica bandas correspondente ao antígeno Ag 2-7 de aproximadamente 45 kDa.

5.9.2 Ensaio de solubilização do antígeno Ag 2-7

Semelhante a solubilização do antígeno Ag 2-5 a solubilização do antígeno Ag 2-7 expresso a 37°C por 4 horas foi realizada ressuspensando o *pellet* resultante da lise em tampão de lavagem Tris HCL pH 8,0; 300 mM NaCl; 2% triton-X100 e sonicação conforme descrito na metodologia. As condições de solubilização avaliadas foram com incubação em tampão Tris HCL pH 8,0; 300 mM de NaCl adicionado de 4 M e 8 M de ureia. Entretanto diferentemente do antígeno Ag 2-5 o antígeno Ag 2-7 foi solubilizado na condição desnaturada em tampão 50 mM tris HCl pH 8; 300 mM NaCl; 4 M e 8 M de ureia. Mesmo apresentando rendimento de solubilidade inferior a proteína desnaturada em tampão: 50 mM tris HCl; 300 mM NaCl; 8 M de ureia pH8,0, optamos por utilizar a fração 4M na FIGURA 28 para ensaios imunológicos pelo grau de pureza obtido na condição com menor adição de ureia.

Figura 28: ANÁLISE DO ENSAIO DE SOLUBILIZAÇÃO POR DESNATURAÇÃO DO ANTÍGENO AG 2-7



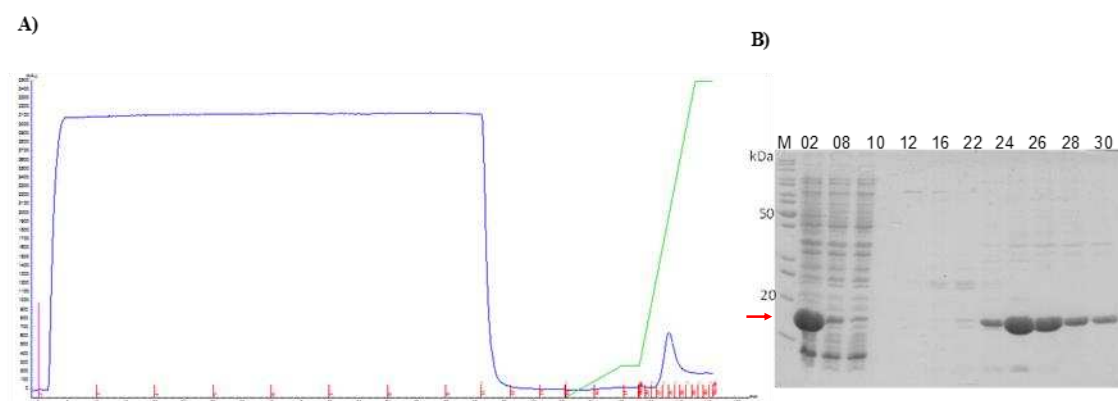
Legenda: Análise em gel de poliacrilamida 15% do ensaio de solubilização do antígeno Ag 2-7. M: Marcador de peso molecular; S: corresponde a fração solúvel após a clarificação; L: corresponde a etapa de lavagem; 4M: corresponde a fração solubilizada com adição de 4M de ureia ao tampão; 8M: corresponde a fração solubilizada com adição de 8M de ureia ao tampão.

5.10 Purificação por afinidade do antígeno Ag 2-12

O antígeno Ag 2-12 (p24 + gp21 HTLV-1) foi expresso de forma solúvel a 37°C por 4 horas e imediatamente submetido a purificação por afinidade em coluna Histrap HP de 1 mL. A purificação foi realizada por gradiente de imidazol. A coluna foi equilibrada em tampão A (50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM imidazol). Após a injeção da amostra a coluna foi lavada em 10 mL de tampão A e em seguida realizamos um gradiente de eluição em tampão B (50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 500 mM imidazol) em duas etapas: O primeiro gradiente de eluição foi com adição gradual de 0 a 10% de tampão B e o segundo gradiente com a dição gradual de 10 a 100% de tampão B. Alíquotas correspondentes as etapas de purificação foram analisadas em gel de poliacrilamida 15%.

Analisando a FIGURA 29 – B observamos que o antígeno Ag 2-12 foi obtido com bom rendimento e grau de pureza satisfatório para realização de imunoenaios nas frações correspondentes ao “pico” de eluição.

FIGURA 29: AVALIAÇÃO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-12



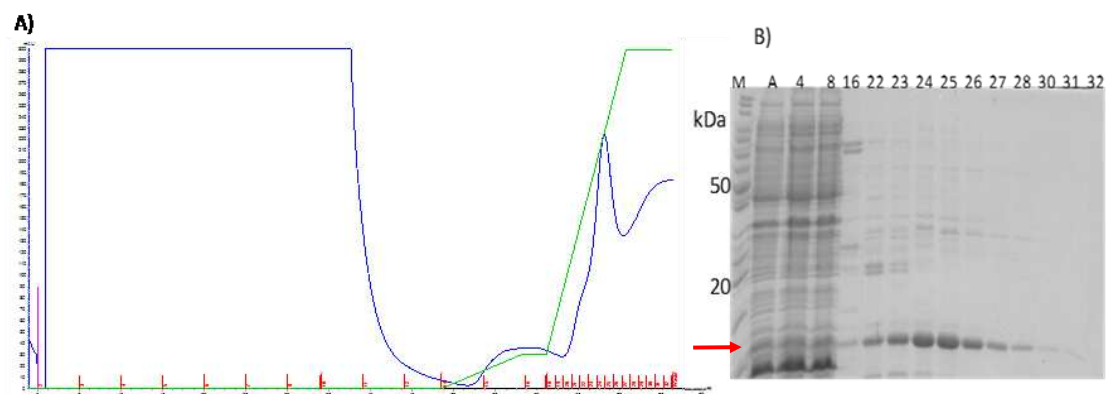
Legenda: Avaliação de purificação por afinidade do antígeno Ag 2-12. A: Cromatograma gerado a partir do gradiente de purificação por afinidade. Linha azul: absorbância a 280 nm; linha verde: gradiente de imidazol (tampão B). B: Análise em gel de poliacrilamida 15%; M: marcador de massa molecular; A: Amostra; 2 e 8: frações correspondentes ao não ligado; 10 e 12: frações correspondentes a etapa de lavagem; 16: fração correspondente ao gradiente 1 de eluição; 22 a 30: frações correspondentes ao gradiente de eluição 2

5.11 Purificação por afinidade em resina de níquel do antígeno Ag 2-13

Assim como o antígeno Ag 2-12 o antígeno Ag 2-13 também foi construído com base na fusão de p24 com gp21 de HTLV-1, este antígeno também foi obtido de forma solúvel na expressão a 37°C por 4 horas. Embora com construções semelhantes o rendimento de expressão foi inferior em comparação ao Ag 2-12. Na fração A do gel de poliacrilamida da FIGURA 30 – B observamos uma banda de aproximadamente 16 kDa indicado pela seta vermelha. Mesmo com baixo rendimento prosseguimos com o ensaio de purificação.

A purificação por afinidade em coluna Histrap HP de 1 mL do antígeno Ag 2-13 também foi realizada em gradiente de imidazol com os mesmos tampões e etapas de eluição utilizados na purificação por afinidade do antígeno Ag 2-12. Analisando o perfil da cromatografia na FIGURA 30 – A observamos a formação de um “pico de eluição” entre as frações 22 e 30, a partir da análise destas frações em gel de poliacrilamida 15% na FIGURA 30 – B, confirmamos a eluição do antígeno Ag 2-13. As frações 26 e 27 desta purificação foram reunidas e concentradas para 1,5 mg/mL e utilizadas para ensaios imunológicos por ELISA.

FIGURA 30: AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-13



Legenda: Análise de purificação por afinidade do antígeno Ag 2-13. A) Perfil cromatográfico para cromatografia de afinidade da proteína Ag 2-13 de HTLV-1. Linha azul: Representa a dinâmica da absorvância em 280 nm ao longo da purificação. Linha verde: O gradiente de eluição. Em vermelho está identificada cada fração coletada ao longo da cromatografia. B) Amostras representativas das frações coletadas aplicadas em gel de poliacrilamida 15% corados com azul de *Coomassie* G-250. A) Amostra solúvel aplicada a coluna de níquel após clarificação.

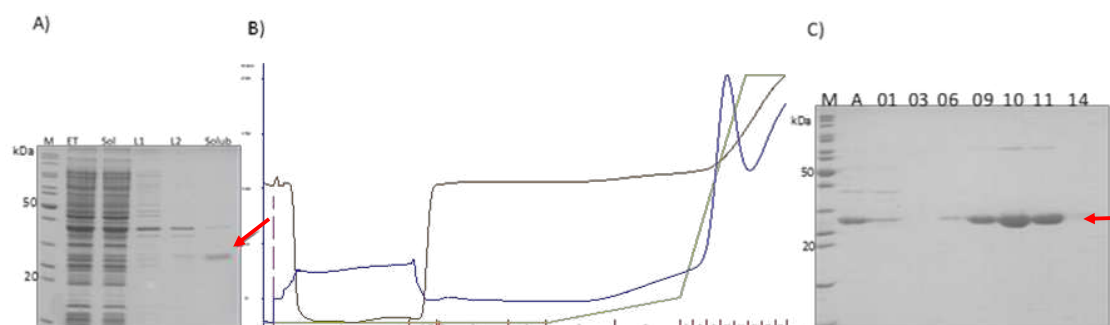
5.12 Solubilização e purificação do antígeno Ag 2-14

O planejamento da construção do antígeno Ag 2-14 foi semelhante aos antígenos Ag 2-7 e Ag 2-15, baseados na fusão a proteína p24 de HTLV-1 com a proteína gp46 de HTLV-1. Entretanto, nesta quimera a região da proteína de envelope gp46 corresponde aos aminoácidos 162 a 222, esta região imunogênica já avaliada no trabalho de Hernández Marin, M et al. (2001).

O antígeno Ag 2-14 foi expresso na forma insolúvel e solubilizado em condição desnaturante em tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 4 M de ureia. Entretanto, tanto na expressão quanto na solubilização por desnaturação deste antígeno observamos baixo rendimento. A seta vermelha da FIGURA 37 – A indica a banda correspondente ao Ag 2-14 solubilizado. Mesmo com baixo rendimento utilizamos a amostra solubilizada para o ensaio de purificação por afinidade ao níquel. Diferente do gradiente aplicado nas demais purificações por afinidade descrita na metodologia, o gradiente 2 de eluição de 10 a 100% de tampão B (50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 4 M ureia; 500 mM imidazol) foi modificado. Ao invés da eluição em 10 volumes de coluna o gradiente 2 foi alterado para 5 volumes de coluna. Assim, não ocorreu maior diluição do antígeno Ag 2-14 durante a eluição.

Mesmo com baixo rendimento e solubilidade, obtivemos quantidade suficiente do antígeno Ag 2-14. Na FIGURA 31 – C entre as frações 09 e 11, podemos observar que foi possível purificar e concentrar a proteína solubilizada apenas na etapa de purificação por afinidade. O rendimento obtido foi de mais de 1 mg do antígeno Ag 2-14 adequado ao uso em ensaios imunológicos.

FIGURA 31: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO AG 2-14

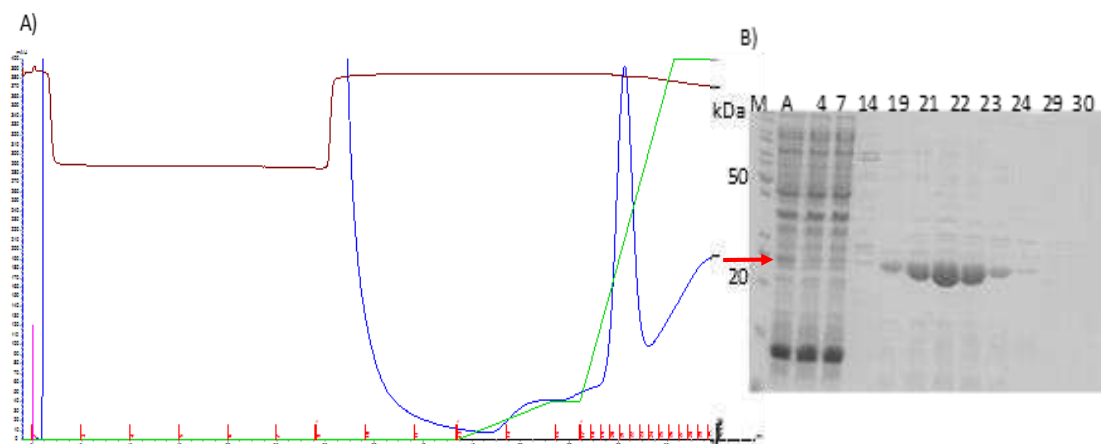


Legenda: A) Etapas de solubilização da proteína Ag 2-14; B) Perfil cromatográfico para cromatografia de afinidade da proteína Ag 2-14 de HTLV-1. Linha azul: Representa a dinâmica da absorbância em 280 nm ao longo da purificação. Linha verde: O gradiente de eluição. Em vermelho está identificada cada fração coletada ao longo da cromatografia. B) Amostras representativas das frações coletadas aplicadas em gel de poliácridamida 15% corados com azul de *Coomassie* G-250. A) Amostra solúvel aplicada a coluna de níquel após clarificação.

5.13 Purificação por afinidade do antígeno Ag 2-15

A construção Ag 2-15 foi planejada realizando a fusão da proteína p24 com a região dos aminoácidos 235 a 261 da proteína de gp46 de HTLV-1. Este antígeno foi expresso de forma solúvel a 37°C por 4 horas. A purificação por afinidade em coluna Histrap HP 1 mL foi realizada em gradiente de imidazol conforme descrito na metodologia. Na FIGURA 32 A e B temos a análise da purificação do antígeno Ag 2-15, observamos que quando comparamos as frações de 21 a 23 do gel de poliácridamida com a fração A correspondente a amostra solúvel aplicada na purificação, além de obter a proteína com alto grau de pureza houve também a concentração de proteína purificada, resultando em aproximadamente 2 mg de proteína adequada a realização de ensaios imunológicos por ELISA.

FIGURA 32: AVALIAÇÃO DA PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 2-15

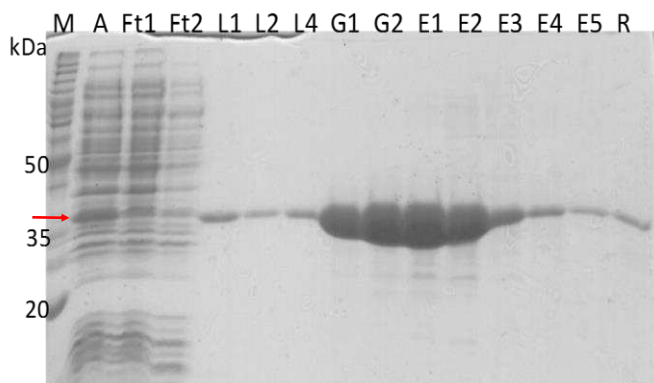


Legenda: Análise de purificação por afinidade do antígeno Ag 2-15. A) Perfil cromatográfico para cromatografia de afinidade da proteína 2-15 de HTLV-1. Linha azul: Representa a dinâmica da absorvância em 280 nm ao longo da purificação. Linha verde: O gradiente de eluição. Em vermelho está identificada cada fração coletada ao longo da cromatografia. B) Amostras representativas das frações coletadas aplicadas em gel de poliacrilamida 15% corados com azul de *Coomassie* G-250. A) Amostra solúvel aplicada a coluna de níquel após clarificação.

5.14 Purificação por afinidade do antígeno Ag 2-16

O antígeno Ag 2-16 foi constituído pela proteína p24 em fusão com a região 103 a 130 da proteína de matriz p19 de HTLV-1. Este antígeno foi expresso de forma solúvel, mas com baixo rendimento. Devido ao baixo nível de expressão como observado na fração A da FIGURA 36. A purificação foi realizada em *microtubos* de 1,5 mL com volume de resina de Ni-Sepharose de 250 μ L. Na FIGURA 36 observamos que o antígeno Ag 2-16 mesmo expresso com baixo rendimento pode ser purificado e concentrado a partir da purificação por afinidade. Na fração G1 temos a proteína eluída com adição de tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 50 mM de imidazol, com alto grau de pureza. Esta fração corresponde a 2 mg de proteína, que é uma quantidade suficiente para aplicação em ensaios imunológicos.

FIGURA 33: AVALIAÇÃO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE EM RESINA DE NÍQUEL DO ANTÍGENO AG 2-16



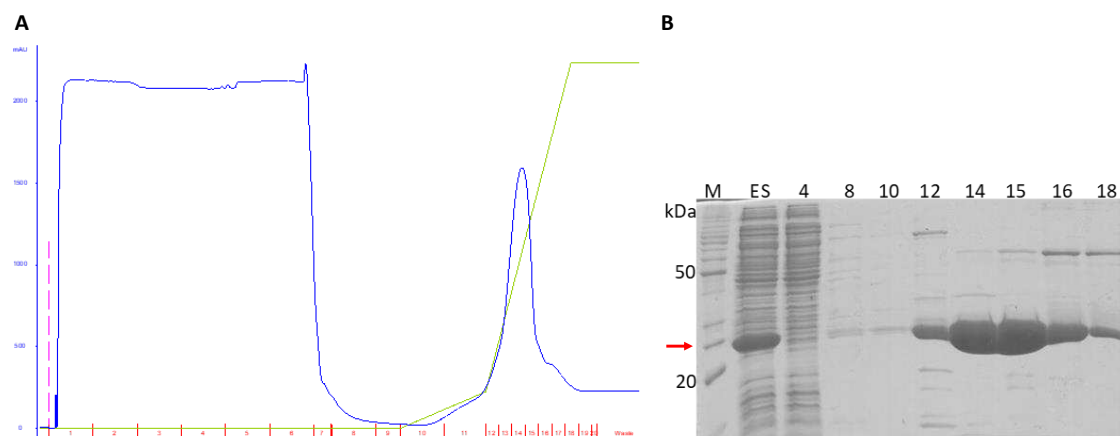
Legenda: Análise em gel de poliácridamida 15% da purificação por afinidade do antígeno Ag 2-16. A: Amostra solúvel; Ft1 e 2: Amostra não ligada a resina; L1 a L4 etapas de lavagem da resina; G1 e 2: Aumento gradual de imidazol; E1 a E5: etapas de eluição com aumento de gradual de imidazol; R: Resina.

5.15 Análise da purificação por afinidade da proteína de capsídeo p24 de HTLV-2, antígeno Ag 3-3.

Assim como a proteína p24 de HTLV-1 o antígeno Ag 3-3 foi expresso a 37°C por 4 horas de forma solúvel, podendo assim ser imediatamente purificado por afinidade a resina de níquel.

O antígeno Ag 3-3 foi purificado por afinidade em coluna Histrap HP 1 mL conforme descrito na metodologia. A eluição deste antígeno ocorreu a partir da adição de 10% de tampão B (50 mM Tris HCl; 300 mM NaCl; 500 mM imidazol), conforme observado no pico de eluição na FIGURA 34 - A. Alíquotas correspondentes as etapas de purificação foram analisadas por eletroforese em gel de poliácridamida 15%. As frações 12 a 18 correspondentes ao pico de eluição correspondem ao antígeno Ag 3-3, analisando a FIGURA 34 - B observamos que este antígeno foi obtido com rendimento e pureza satisfatórios para uso em ensaios imunológicos por ELISA. As frações de 14,15 e 16 foram reunidas, quantificadas e diluídas para a concentração final de 2 mg/mL.

FIGURA 34: ANÁLISE DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 3-3

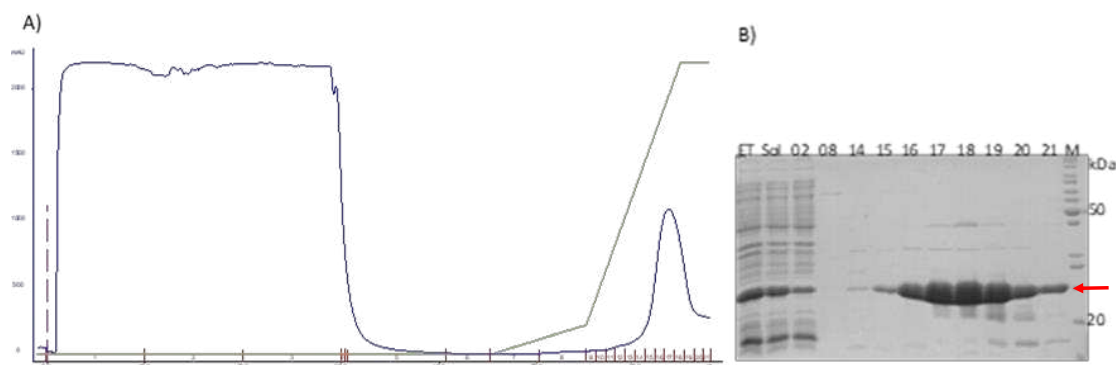


Legenda: Avaliação de purificação por afinidade do antígeno Ag 3-1. A: Cromatograma gerado a partir do gradiente de purificação por afinidade. Linha azul: absorbância a 280 nm; linha verde: gradiente de imidazol (tampão B). B: Análise em gel de poliácridamida 15%; M: marcador de massa molecular; ES: Amostra aplicada a purificação (extrato solúvel); 4: fração correspondente as amostras não ligadas a coluna; 8: fração correspondente a etapa de lavagem da coluna; 10: fração correspondente ao gradiente 1 de eluição; 12 a 18 frações correspondentes ao gradiente 2 de eluição.

5.16 Purificação por afinidade do antígeno AG 3-4

O antígeno Ag 3-4 foi produzido em forma de proteína única, corresponde a proteína p19 de matriz de HTLV-2. Este antígeno foi expresso de forma solúvel a 37°C por 4 horas. A purificação por afinidade foi realizada em coluna Histrap HP de 1 mL, utilizando um gradiente de eluição por imidazol em duas etapas conforme descrito na metodologia. Analisando o cromatograma da purificação por afinidade do antígeno Ag 3-4, na FIGURA 35 - A observamos um pico de eluição a partir a adição de 30% de tampão B (50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 500 mM imidazol). Na análise por eletroforese em gel de poliácridamida as frações 14 a 21 correspondentes ao pico de eluição apresentam banda de aproximadamente 25 kDa correspondente a massa estimada para o antígeno Ag 3-4. Para este antígeno a purificação realizada por cromatografia de afinidade ao níquel resultou em alto rendimento de proteína purificada, reunindo as frações de 16 a 19 da FIGURA 35 – B foi possível obter 5 mg de proteína p19 de HTLV-2 em um volume de expressão de 500 mL de meio de cultivo.

FIGURA 35: AVALIAÇÃO DE PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 3-4



Legenda: A) Perfil cromatográfico para cromatografia de afinidade do antígeno Ag 3-4 de HTLV-1. Linha azul: Representa a dinâmica da absorbância em 280 nm ao longo da purificação. Linha verde: O gradiente de eluição. Em vermelho está identificada cada fração coletada ao longo da cromatografia. B) Amostras representativas das frações coletadas aplicadas em gel de poliacrilamida 15% corados com azul de Coomassie G-250. A) Amostra solúvel aplicada a coluna de níquel após clarificação.

5.17 Expressão, solubilização e purificação por afinidade do antígeno Ag 3-5

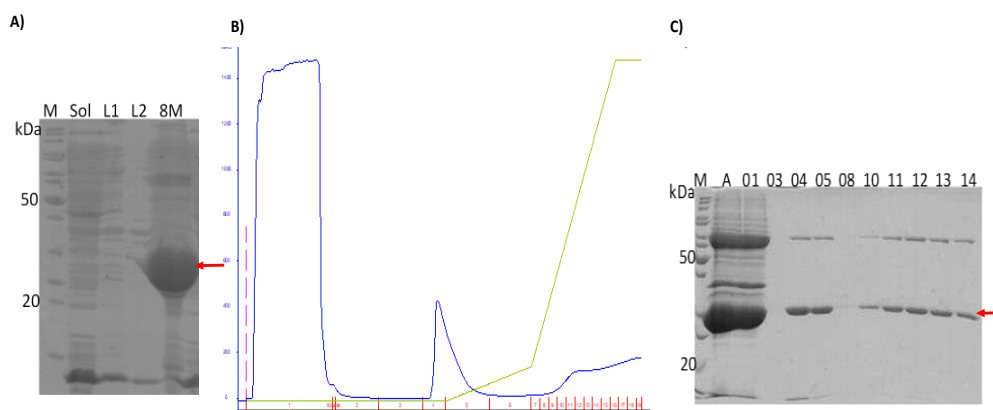
O planejamento da construção quimérica do antígeno Ag 3-5 foi baseado na fusão da proteína p24 de HTLV-2 com a proteína gp21 de HTLV-2. A avaliação da solubilização do antígeno Ag 3-5 expresso a 37°C por 4 horas foi realizada ressuspensando o *pellet* resultante da lise em tampão de lavagem Tris HCL pH 8,0; 300 mM NaCl; 2% triton-X100 e sonicação conforme descrito na metodologia. A condição de solubilização avaliada foi com incubação em tampão Tris HCl pH 8,0; 300 mM de NaCl adicionado de 8 M e de ureia. Aliquotas correspondentes as etapas de expressão, lise, lavagem e solubilização foram aplicadas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

O antígeno Ag 3-5 foi solubilizado apenas na condição desnaturante em tampão 50 mM Tris HCl pH 8; 300 mM NaCl; 8 M ureia. A fração 8M do gel de poliacrilamida na FIGURA 36 – A corresponde ao antígeno solubilizado utilizado na purificação por afinidade em resina de níquel.

A purificação por afinidade ao níquel do antígeno quimérico Ag 3-5 foi realizada em gradiente de imidazol. A coluna de níquel (Histrap HP GE de 1 mL) foi equilibrada em tampão A composto de 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM

NaCl; 8 M de ureia. Após a injeção a coluna foi lavada com 5 mL de tampão A em seguida foi realizada a adição gradual de 0 a 10% de tampão B (50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M ureia; 500 mM imidazol). A eluição foi realizada em gradiente linear de 10 mL de 10 a 100% de tampão B. A FIGURA 36 – B apresenta o cromatograma correspondente a esta purificação, analisando este cromatograma observamos um pico ao final da etapa de lavagem e início do gradiente 1 de eluição, alíquotas correspondentes as etapas de purificação foram aplicadas a eletroforese em gel de poliacrilamida. Analisando a fração 1 da FIGURA 36 - C observamos que maior parte do antígeno alvo não se ligou a resina de níquel, nas frações 4 e 5 correspondentes ao maior pico presente no cromatograma observamos bandas correspondentes ao antígeno Ag 3-5, o mesmo ocorreu no pico de menor intensidade entre as frações 8 a 14. Entretanto, as frações correspondentes ao primeiro pico possuíam volume de 5 mL enquanto as frações do gradiente 2 de eluição tinham volume de 1 mL em cada. Assim optamos por reunir as frações 4 e 5 e concentrar o volume final para 5 mL, obtendo assim o antígeno Ag 3-5 a 1,5 mg/mL.

FIGURA 36: AVALIAÇÃO DA SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO POR AFINIDADE DO ANTÍGENO AG 3-5



Legenda: A) Análise em gel de poliacrilamida 13% corado por azul de Coomassie G-250. M: Marcador de proteínas (kDa); ET: Extrato total; Sol: Fração solúvel após lise e clarificação; L1: Lavagem em tampão contendo 2% de triton X-100; L2: Lavagem em tampão contendo 2 M de ureia; Solub: Produto da solubilização em tampão contendo 8 M de ureia. B) Perfil cromatográfico para cromatografia de afinidade da proteína Ag 3-5 de HTLV-1. Linha azul: Representa a dinâmica da absorbância em 280 nm ao longo da purificação. Linha verde: O gradiente de eluição. Em vermelho está identificada cada fração coletada ao longo da cromatografia. C) Amostras representativas das frações coletadas aplicadas em gel de poliacrilamida 15% corados com azul de Coomassie G-250. A) Amostra solúvel aplicada a coluna de níquel após clarificação.

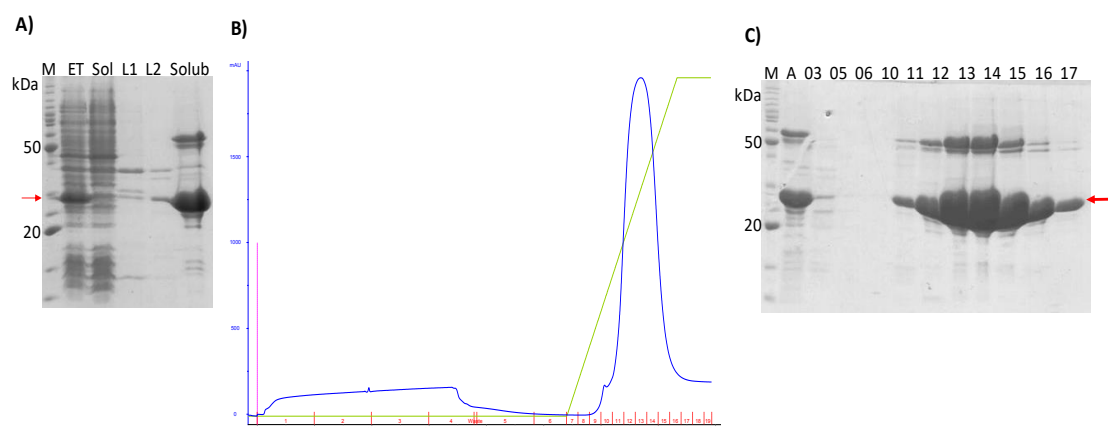
5.18 Expressão, solubilização e purificação do antígeno Ag 3-7

O antígeno quimérico Ag 3-7 foi desenvolvido a partir da fusão da proteína p24 de HTLV-2 a proteína gp46 de HTLV-2. Este antígeno foi expresso na forma insolúvel a 37°C, a solubilização do antígeno Ag 3-7 foi realizada ressuspensando o *pellet* resultante da lise em tampão de lavagem Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 2% triton-X100 e sonicação conforme descrito na metodologia. A condição de solubilização avaliada foi com incubação em tampão Tris HCl pH 8,0; 300 mM de NaCl adicionado de 8 M e de ureia. Alíquotas correspondentes as etapas de expressão, lise, lavagem e solubilização foram aplicadas a eletroforese em gel de poliacrilamida.

O antígeno Ag 3-7 foi solubilizado na condição desnaturante em tampão 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M ureia. A fração “solub” do gel de poliacrilamida na FIGURA 37 – A corresponde ao antígeno solubilizado.

A purificação por afinidade ao níquel do antígeno quimérico Ag 3-7 foi realizada em gradiente de imidazol em coluna Histrap HP de 1 mL. A coluna de níquel foi equilibrada em tampão A composto de 50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M ureia. Após a injeção, a coluna foi lavada com 5 mL de tampão A em seguida a eluição ocorreu em um gradiente linear de 0 a 100% de tampão B (50 mM Tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 8 M ureia; 500 mM imidazol. A FIGURA 37 – B apresenta o cromatograma correspondente a esta purificação. Analisando este cromatograma observamos um pico na etapa de eluição a partir de 12% de tampão B, as alíquotas correspondentes as etapas de purificação foram analisadas em gel de poliacrilamida. Conforme esperado, as frações de 11 a 17 da FIGURA 36 - C corresponderam ao antígeno alvo. Estas frações foram reunidas e diluídas para a concentração final de 2 mg/mL.

FIGURA 37: SOLUBILIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ANTÍGENO AG 3-7

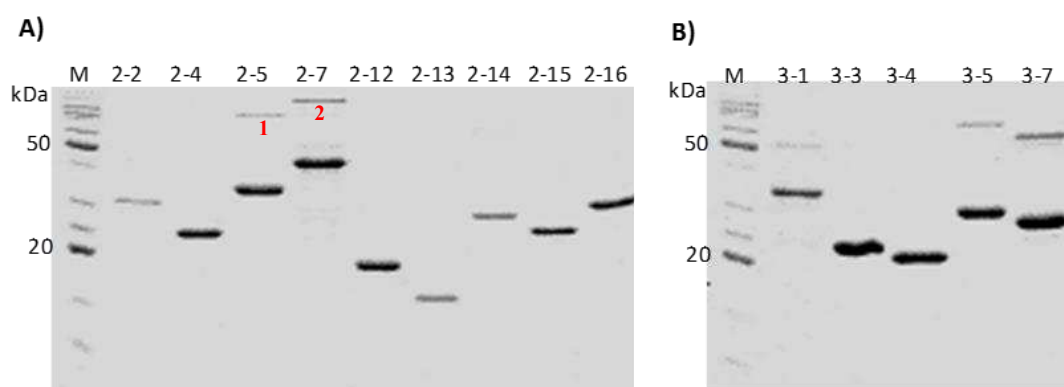


Legenda: A) Análise em gel de poliacrilamida 13% corado por azul de Coomassie G-250. M: Marcador de proteínas (kDa); ET: Extrato total; Sol: Fração solúvel após lise e clarificação; L1: Lavagem em tampão contendo 2% de triton X-100; L2: Lavagem em tampão contendo 2 M de ureia; Solub: Produto da solubilização em tampão contendo 8 M de ureia. B) Cromatograma Akta Purifier. Linha verde gradiente de imidazol; linha azul: sinal de absorbância em 280 nm. Frações de 10 – 17 correspondem as frações do pico de eluição. C) Amostras representativas das frações coletadas analisadas em gel de poliacrilamida 13% corado por azul de Coomassie G-250. M: Marcador de proteínas (kDa); A: Amostra aplicada; 03 – 17 frações correspondentes ao gradiente de purificação.

5.19 Conjunto de antígenos obtidos

A partir da eletroforese em gel de poliacrilamida pudemos avaliar o grau de pureza dos antígenos produzidos. Todos os antígenos alcançaram rendimento e grau de pureza satisfatórios para utilização em ensaios imunológicos. Na FIGURA 38 - A observamos o padrão de bandas esperado para as proteínas recombinantes de HTLV-1 e a FIGURA 38 - B apresenta o padrão de bandas das proteínas recombinantes de HTLV-2.

FIGURA 38: GEL DE POLIACRILAMIDA DOS ANTÍGENOS DE HTLV-1 E 2



Legenda: Análise em gel de poliacrilamida dos antígenos produzidos. A) Antígenos recombinantes de HTLV-1. M: marcador de proteínas em quilodaltons (kDa); 2-2: gp21+gp46; 2-4 p24; 2-5: p24+gp21; 2-7: p24+gp46; 2-12: p24 (D130) + gp21; 2-13: p24 (D130) + gp21 (K 404); 2-14: p24 + gp46 (L162-N222); p24+gp46 (S235-A261); 2-16: p19 + p24. B) Antígenos recombinantes de HTLV-2. 3-1: gp21+gp46; 3-3: p24; 3-4: p19; 3-5: p24+gp21; 3-7: p24+gp46.

Além das bandas correspondentes as massas esperadas, observamos bandas de proteínas com massas maiores para os antígenos Ag 2-5, Ag 2-7, Ag 3-1, Ag 3-5 e Ag 3-7 acima das proteínas alvo. O antígeno Ag 2-5 apresenta uma banda de 85 kDa (1) e Ag 2-7 com uma banda de 100 kDa (2). Ag 3-1 apresenta uma banda de 60 kDa, Ag 3-5 com uma banda de 70 kDa e Ag 3-7 com uma banda de 65 kDa.

As bandas identificadas por 1 e 2 na FIGURA 38 – A foram excisadas do gel e encaminhadas a Plataforma de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ PR para identificação de peptídeos. A FIGURA 39 apresenta os resíduos de peptídeos identificados por espectrometria de massa das bandas 1 (85 kDa) e 2 (100 kDa) estão marcados na sequência de aminoácidos dos antígenos Ag 2-5 na FIGURA 39 – A e do antígeno Ag 2-7 na FIGURA 3-9 – B.

FIGURA 39: PEPTÍDEOS IDENTIFICADOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A	B
MAGSASMK <u>DLQAIKQEV</u> SQAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDL QDLLQYLC <u>SSLV</u> ASLHHQQLDSL <u>SE</u> ETR <u>GIT</u> GYN <u>PLA</u> GPLRVQANNP QQQGLRREYQQLWLAFAALPGSAKDP _{SWAS} IL <u>QGL</u> EEPYHAF <u>VER</u> L <u>NIALD</u> NGLPEGTPKDPILRSLAYSANKECQKLLQARCGGSSMSLAS GKSLLEHVDKDISQLTQAIVKNHK _{NLLGHTNSPLGDML} RAKIAQYAAQ NR <u>RGLDLLFWEQGGLCKALQECCFLNITNSHVSILQERPPLEN</u>	MAGSASMK <u>DLQAIKQEV</u> SQAAPGSPQFMQTIRLAVQQFDPTAKDL QDLLQYLC <u>SSLV</u> ASLHHQQLDSL <u>SE</u> ETR <u>RGITGYNPLAGPLRVQANN</u> <u>PQQQGLRREYQQLWLAFAALPGSAK</u> DP _{SWAS} ILQGLEEYPYHAFVE RRSLAYSANKECQKLLQARGHTNSPLGDMLRACQGGSSVDAPGYD PL <u>NIALD</u> NGLPEGTPKDPILWFLNTEPSQLPPTAPPLSHSNLDHILEP SI <u>PWKS</u> KLLTLVQLTLQSTNYTCIVCIDRASLSTWHVLYSPNVSPSPST PLLYPSLALPAPHLTPFNWTHCFDPQIQAIVSSPCHNSLILPPFSLSPVP TL <u>GSR</u> SRRRAVPVAVWLVSALAMGAGVAGRITGS

Legenda: Análise das bandas excisadas do gel analisadas por espectrometria de massas. A. Banda 1, sequência de aminoácidos do antígeno Ag 2-5, os resíduos em vermelho sublinhados correspondem aos peptídeos identificados por espectrometria de massa; B) Banda 2, sequência de aminoácidos do antígeno Ag 2-7, os resíduos em vermelho sublinhados correspondem aos peptídeos identificados por espectrometria de massa.

Considerando que os peptídeos identificados pertencem aos antígenos Ag 2-5 e Ag 2-7 concluímos que estas bandas correspondem a oligômeros destes antígenos. As bandas acima dos antígenos Ag 3-1, 3-5 e 3-5 não foram analisadas, entretanto presumimos que se trata do mesmo perfil de formação de oligômeros destas proteínas.

O rendimento e as condições finais de tampão em que foram obtidos os antígenos estão descritos resumidamente na TABELA 7.

TABELA 7: RESUMO DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE HTLV-1 E 2

Antígeno	Massa (kDa)	Expressão	Solubilização	Método	Concentração (mg/mL)
2-2	33	Insolúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; de 4 M de ureia.	Afinidade	0,75
2-4	25	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 500 mM NaCl	Afinidade	4,0
2-5	35	Insolúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; de 2 M de ureia	Afinidade	2,0
2-7	44	Insolúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 500 mM NaCl; de 4 M de ureia	Obtida a partir das lavagens dos corpos de inclusão	2,0
2-12	19	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl	Afinidade	2,0
2-13	15	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl	Afinidade	1,5
2-14	30	Insolúvel	300 mM NaCl; 4 M de ureia	Afinidade	1,0
2-15	25	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl	Afinidade	1,0
2-16	25	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl	Afinidade	2,0
3-1	34	Insolúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 4 M de ureia	Obtida a partir das lavagens dos corpos de inclusão	1,0
3-3	24	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl	Afinidade	4,0
3-4	16	Solúvel	50 mM tris HCl pH 8,0; 300 mM NaCl	Afinidade	2,0
3-5	30	Insolúvel	50 mM tris HCl; 300 mM NaCl; 8 M de ureia pH 8,0	Afinidade	1,5
3-7	30	Insolúvel	50 mM tris HCl; 300 mM NaCl; 8 M de ureia pH 8,0	Afinidade	2,0

Fonte: O autor.

5.20 Padronização de ensaios de ELISA

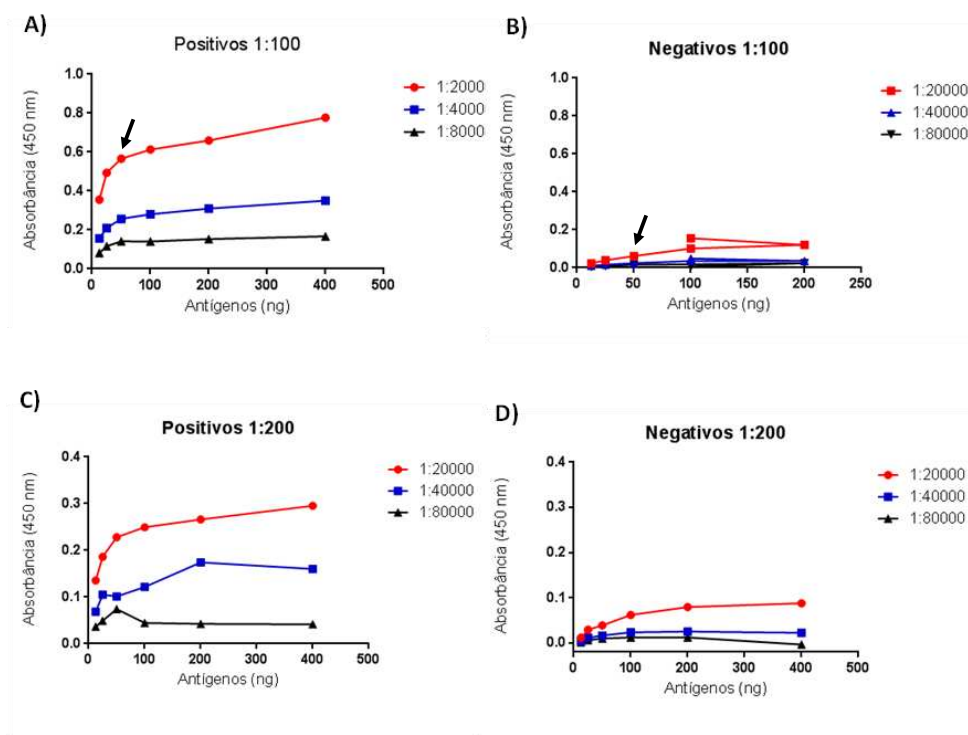
A etapa de padronização de ensaios imunológicos consistiu em testar uma série de parâmetros como: quantidade de antígeno, condições de tampão, temperatura de incubação, condições de lavagem, diluição de soros e de anticorpos secundários. Por consequência um elevado consumo de soro. Devido à pouca disponibilidade de soros nos limitamos a padronizar as condições de ensaio com um único antígeno.

Para o ensaio de padronização de ELISA indireto, utilizamos o antígeno Ag 2-5 (p24 + gp21 de HTLV-1) visto que o perfil de anticorpos das amostras sorológicas é desconhecido. Assim espera-se que as amostras séricas positivas possuam anticorpos contra um ou ambos antígenos constituídos nesta quimera.

Portanto avaliamos a deposição do antígeno Ag 2-5 nos poços nas quantidades de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 ng por poço. As diluições dos soros foram avaliadas nas proporções 1:100 e 1:200. O anticorpo secundário foi avaliado nas diluições 1:20000, 1:40000 e 1:80000.

Através da análise da absorbância obtida nos ensaios sorológicos demonstrados na FIGURA 40 foi possível estabelecer a diluição dos soros e a diluição do anticorpo secundário (anti-IgG humano). Portanto, a melhor condição estabelecida foi a diluição dos soros na proporção 1:100 e o anticorpo secundário diluído na proporção 1:20000. Foi possível também concluir que em concentrações de antígeno acima de 50 ng (indicados pela seta preta), não houve aumento de absorbância proporcional, assim estabelecemos que a quantidade de 50 ng de antígeno por poço é uma condição adequada a realização de ensaios imunológicos para este antígeno.

FIGURA 40: AVALIAÇÃO DA PADRONIZAÇÃO DOS ENSAIOS POR ELISA



Legenda: Análise gráfica da absorbância A) amostras séricas positivas para HTLV diluídas 100 vezes; B) Amostras séricas negativas para HTLV diluídas 100 vezes; C) amostras séricas positivas para HTLV diluídas 200 vezes; D) amostras séricas negativas para HTLV diluídas 200 vezes. Linha vermelha: Anticorpo anti-IgG humano diluído 20000 vezes; linha azul: Anticorpo anti-IgG humano diluído 40000 vezes; linha preta: anticorpo anti-IgG humano diluído 80000 vezes.

5.21 Ensaios imunológicos por ELISA antígenos de HTLV-1 e 2

Os ensaios imunológicos por ELISA foram realizados em 188 amostras de soro cedidas pelo Dr. Fred Luciano Neves Santos, sendo 94 amostras positivas provenientes do Instituto Gonçalo Muniz – FIOCRUZ - BA e 94 amostras negativas provenientes do Hemocentro do Estado da Bahia (HEMOBA).

Os ensaios foram realizados com 50 ng de antígeno por poço, os soros foram diluídos na proporção 1:100 e o anticorpo anti-IgG humano conjugado com peroxidase diluído na proporção 1:20000.

Nos ensaios imunológicos por ELISA com o antígeno Ag 2-2 (gp21 + gp46 de HTLV-1) avaliamos o índice de reatividade frente a soros de pacientes infectados e não infectados pelo vírus HTLV-1/2. Entre os 94 soros positivos e 94 soros negativos para HTLV-1/2. O antígeno Ag 2-2 identificou 90 amostras

positivas (índice de reatividade ≥ 1) alcançando a sensibilidade de 95,74%, entre as amostras negativas foram identificadas 9 como falso-positivas obtendo a especificidade de 90,43%). O gráfico de dispersão das amostras sorológicas em relação ao índice de reatividade da FIGURA 41 – A demonstra que a média do índice de reatividade para amostras positivas foi de 1,52 enquanto que a média dos soros negativos foi de 0,72, observamos também que 8 amostras negativas e 5 amostras positivas apresentaram índice de reatividade entre 0,9 – 1,10 (zona cinza).

O antígeno Ag 2-4 (p24 de HTLV-1) avaliado com o mesmo conjunto de soros identificou 84 amostras positivas alcançando a sensibilidade de 90,43%. Este antígeno identificou 11 amostras negativas como falso-positivas alcançando a especificidade de 88,30%. Na FIGURA 41 – B observamos que a média de reatividade dos soros positivos foi de 1,68 enquanto nos soros negativos foi de 0,82. Avaliando a zona cinza para este antígeno identificamos 28 amostras, sendo 21 negativas e 7 amostras positivas.

O antígeno Ag 2-5 (p24 + gp21 de HTLV-1) identificou corretamente 93 das 94 amostras positivas obtendo a sensibilidade de 98,94%. Este antígeno obteve também a mesma sensibilidade pois identificou apenas 1 soro negativo erroneamente. A média de reatividade das amostras positivas foi de 2,30 e das amostras negativas foi de 0,76 (FIGURA 41 – C). Nos ensaios realizados com este antígeno 18 amostras obtiveram reatividade na zona cinza (16 negativas e 2 positivas).

O antígeno Ag 2-7 (p24 + gp46 de HTLV-1) não identificou 3 das 94 amostras positivas obtendo a sensibilidade de 96,81%. Dentre as amostras negativas, identificou 4 como falso-positivas alcançando a especificidade de 95,74%. Analisando a FIGURA 41 – D observamos que a média de reatividade dos soros positivos foi de 2,32 enquanto nos soros negativos foi de 0,76. Nos ensaios realizados com este antígeno 22 amostras apresentaram reatividade na zona cinza, sendo 18 negativas e 4 positivas.

Nos ensaios por ELISA com o antígeno Ag 2-12 [(p24 D130) (gp21 338 – 421)] 91 amostras positivas foram corretamente identificadas, obtendo a sensibilidade de 96,81%. Dentre as amostras negativas este antígeno identificou 5 amostras negativas como falso-positivas, tendo assim uma especificidade de 94,68%. Na FIGURA 41 – E observamos que a média de

reatividade dos soros positivos foi de 1,37 e para os negativos foi de 0,74. 24 amostras permaneceram na faixa de reatividade da zona cinza sendo 12 positivas e 12 negativas.

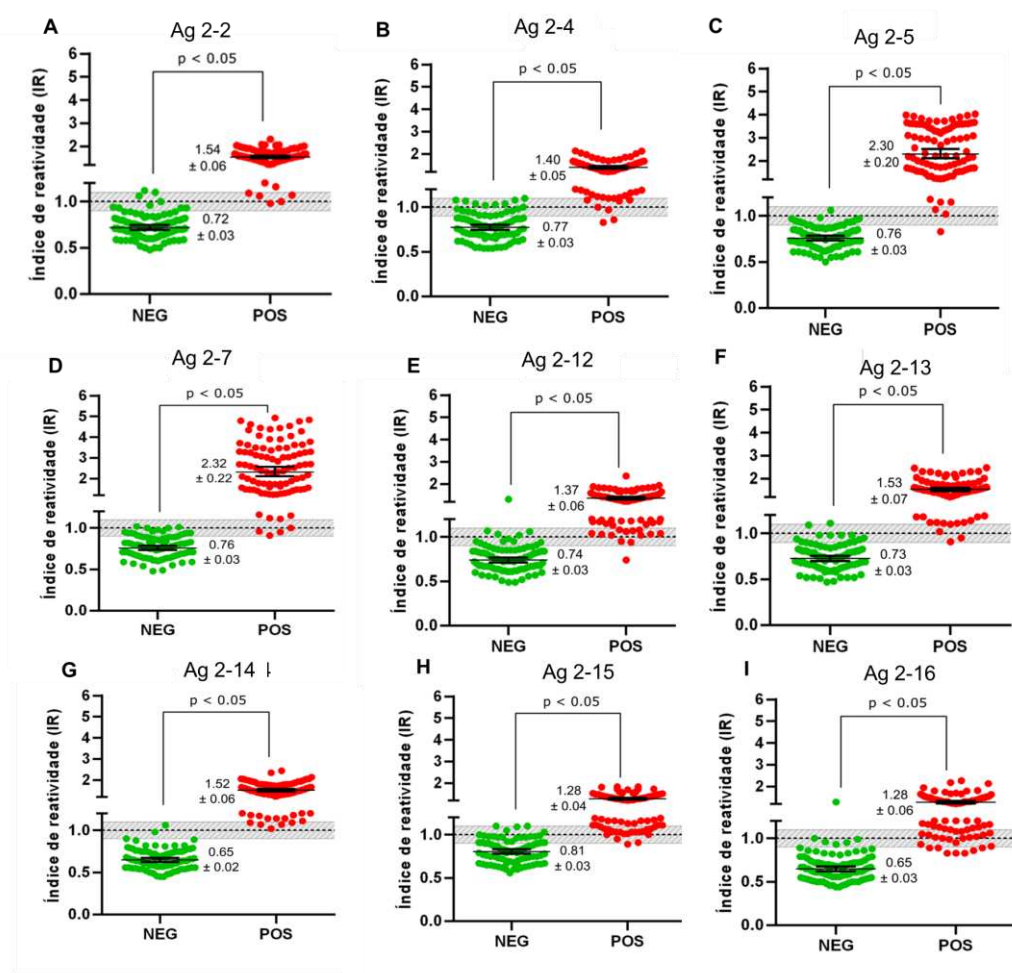
O antígeno Ag 2-13 [(p24 D130) (gp21 404 – 456)] com construção quimérica semelhante aos antígenos Ag 2-7 e Ag 2-12, identificou 92 dos soros positivos e negativos corretamente, obtendo sensibilidade e especificidade de 97,87%. A média de reatividade dos positivos para este antígeno foi de 1,53 e para os negativos foi de 0,73 (FIGURA 41 – F). Para este antígeno 16 amostras obtiveram reatividade na faixa da zona cinza, sendo 12 amostras negativas e 4 positivas.

Nos ensaios realizados com o antígeno Ag 2-14 [(p24) (gp46 162 – 222)] todas as 94 amostras positivas foram corretamente identificadas, alcançando a sensibilidade de 100%, uma das 94 amostras negativas foi identificada como falso-positiva, obtendo a especificidade de 98,94%. Na FIGURA 41 – G destacamos que a média de reatividade das amostras positivas foi de 1,52 e para as amostras negativas foi de 0,65. Apenas 8 amostras obtiveram índice de reatividade na faixa da zona cinza, 3 amostras negativas e 5 amostras positivas.

O antígeno Ag 2-15 [(p24) (gp46 235 – 261)] possui construção quimérica semelhante a Ag 2-7 e 2-14. Nos ensaios imunológicos por ELISA o antígeno Ag 2-15 identificou corretamente 91 amostras positivas obtendo sensibilidade de 96,81% e identificou como falso-positivas 6 amostras negativas, permanecendo a especificidade em 93,62%. Analisando a FIGURA 41 – H observamos que a média de reatividade dos soros positivos foi de 1,28 enquanto para os soros negativos foi de 0,81. Um total de 49 amostras permaneceu com reatividade na faixa da zona cinza, 30 negativas e 19 positivas.

O antígeno Ag 2-16 baseado na quimera p24 em fusão com p19 de HTLV-1 identificou corretamente 83 das 94 amostras positivas (sensibilidade de 88,30%) e entre as amostras negativas identificou apenas duas amostras como sendo falso-positivas alcançando a especificidade de 97,87%. Nos ensaios com este antígeno, 22 amostras tiveram reatividade na faixa da zona cinza, sendo 5 negativas e 17 positivas.

FIGURA 41: ANÁLISE DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS POR ELISA COM OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-1



Legenda: Análise do índice de reatividade dos antígenos de HTLV-1. A) Antígeno Ag 2-2 (gp21gp46); B) antígeno Ag 2-4 (p24); C) Antígeno Ag 2-5 (p24gp21); D) Antígeno Ag 2-7 (p24gp46); E) Antígeno Ag 2-12 [(p24D130) (gp21)]; F) Ag 2-13 [(p24D130) (gp21 404 – 456)]; G) Ag 2-14 [(p24) (gp46 166 – 222)]; H) Ag 2-15 [(p24) (gp46 235 – 261)]; I) Ag 2-16 (p24p19).

A TABELA 8 resume o desempenho dos antígenos de HTLV-1 frente às amostras de soros.

TABELA 8: PARÂMETROS DE DESEMPENHO DOS ANTÍGENOS DE HTLV-1

Antígenos	Linha de corte	AUC	Sens (IC 95%)	Esp (IC 95%)
Ag 2-2	0,55	0,998	98,9% (94,22 - 99,81)	95,74% (89,56 - 98,34)
Ag 2-4	0,51	0,989	96,8% (91,03 - 99,34)	90,43% (82,80 - 94,88)
Ag 2-5	0,67	0,996	98,9% (94,22 - 99,81)	98,9% (94,22 - 99,81)
Ag 2-7	0,58	0,986	96,8% (91,03 - 98,91)	95,7% (89,56 - 98,33)
Ag 2-12	0,49	0,986	96,8% (91,03 - 98,91)	94,6% (88,15 - 97,71)
Ag 2-13	0,52	0,997	97,8% (92,57 - 99,41)	97,8% (92,57 - 99,41)
Ag 2-14	0,57	0,999	100% (96,07 - 100)	98,4% (94,22 - 99,81)
Ag 2-15	0,60	0,984	96,8% (91,03 - 98,91)	93,6 % (86,77 - 97,04)
Ag 2-16	0,49	0,986	88,3% (80,25 - 93,34)	97,8 % (92,57 - 99,41)

Nota: AUC: área da curva ROC; Sens: Sensibilidade (%); Esp: Especificidade (%); IC 95%: Intervalo de confiança (%).

Os ensaios por ELISA com antígenos de HTLV-2 foram realizados igualmente aos antígenos de HTLV-1. Entretanto o conjunto de soros não foi previamente genotipado para identificação de quais correspondem a HTLV-1 e HTLV-2. Portanto o conjunto de amostras refere-se a soros HTLVs sem distinção de subtipos.

Nos ensaios imunológicos por ELISA com o antígeno Ag 3-1 (gp21 + gp46 de HTLV-2) avaliamos o índice de reatividade frente a soros de pacientes infectados e não infectados pelo vírus HTLV-1/2. Entre os 94 soros positivos e 94 soros negativos para HTLV-1/2, o antígeno Ag 3-1 identificou 89 amostras positivas (índice de reatividade ≥ 1) alcançando a sensibilidade de 94,68%. Dentre para os soros negativos foram identificados 8 como falso – positivos obtendo a especificidade de 91,49%. O gráfico de índice de reatividade da FIGURA 42 – A demonstra que a média de reatividade para amostras positivas foi de 1,43 enquanto a média dos soros negativos foi de 0,79, observamos

também que 20 amostras negativas e 12 amostras positivas apresentaram índice de reatividade entre 0,9 – 1,10 (zona cinza).

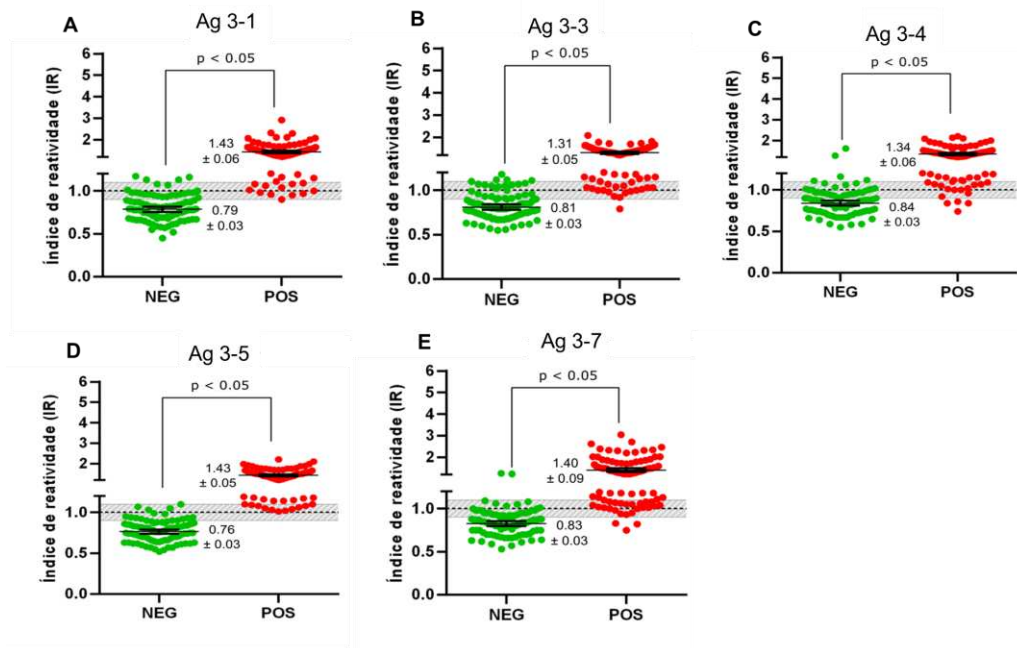
O antígeno Ag 3-3 (p24 de HTLV-2) avaliado com o mesmo conjunto de amostras identificou corretamente 88 das 94 amostras positivas (sensibilidade de 93,62%). Em relação aos soros negativos identificou 15 amostras como falso-positivas (especificidade de 84,04%). 42 amostras sorológicas apresentaram índice de reatividade na faixa da zona cinza, sendo 24 negativas e 18 positivas.

O antígeno Ag 3-4 (p19 de HTLV-2) identificou como positiva 88 das 94 amostras obtendo uma sensibilidade de 93,62%. Das 94 amostras negativas identificou 15 como falso-positivas tendo uma especificidade de 84,04%. A média de reatividade entre as amostras positivas foi 1,34 e para as amostras negativas foi de 0,84 (FIGURA 42 – C). Entre os 188 soros analisados 43 amostras obtiveram índice de reatividade na faixa cinza, sendo 30 negativas e 13 positivas.

O antígeno Ag 3-5 (p24 + gp21 de HTLV-2) obteve 100% de sensibilidade identificando corretamente todas as 94 amostras positivas. Entre as amostras negativas 4 foram identificadas como falso-positivas alcançando a especificidade de 95,74%. Na FIGURA 42 - D observamos que a média de reatividade dos soros positivos foi de 1,43 e para os soros negativos foi de 0,76. Entre as amostras que obtiveram reatividade na faixa da zona cinza 16 são de soros negativos e 11 de soros positivos.

O antígeno Ag 3-7 (p24gp46 de HTLV-2) analisado no mesmo conjunto de soros obteve sensibilidade de 92,55% identificando corretamente 87 amostras positivas. A especificidade foi de 89,36% no qual identificou erroneamente 10 amostras negativas como positivas. A média de índice de reatividade demonstrado na FIGURA 42 – E foi de 1,40 para as amostras positivas e 0,83 para as amostras negativas. Para o antígeno Ag 3-7 52 amostras tiveram reatividade na faixa da zona cinza sendo 30 negativos e 22 positivos.

FIGURA 42: RESULTADO DOS ENSAIOS IMUNOLÓGICOS POR ELISA COM OS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-2



Legenda: Análise do índice de reatividade dos antígenos de HTLV-2. A) Antígeno Ag 3-1 (gp21gp46); B) Antígeno Ag 3-3 (p24); C) Antígeno Ag 3-4 (p19); D) Antígeno Ag 3-5 (p24 + gp21); E) Antígeno Ag 3-7 (p24 + gp46)

A tabela 9 resume os dados obtidos a partir dos ensaios por ELISA com os antígenos de HTLV-2.

TABELA 9: PARÂMETROS DE DESEMPENHO DOS ANTÍGENOS DE HTLV-2.

Cód.	Linha de corte	AUC	Sens (IC 95%)	Esp (IC 95%)
Ag 3-1	0,48	0,985	94,6% (88,15 - 97,71)	91,4% (84,10 – 95,62)
Ag 3-3	0,67	0,966	93,6% (86,77 - 97,04)	84,0% (75,33 - 90,08)
Ag 3-4	0,61	0,949	93,6% (86,77 - 97,04)	84,0% (75,33 - 90,08)
Ag 3-5	0,53	0,997	100% (96,07 - 100)	95,7% (89,56 - 98,33)
Ag 3-7	0,62	0,956	92,5% (85,42 - 96,35)	89,3% (81,51 – 94,12)

Nota: AUC: área da curva ROC; Sens: Sensibilidade (%); Esp: Especificidade (%); IC 95%: Intervalo de confiança (%)

5.22 Avaliação do índice de reatividade dos ensaios imunológicos por ELISA realizados com combinação dos antígenos recombinantes de HTLV-1

Além dos ensaios com os antígenos individuais, realizamos ensaios combinando mais de um antígeno por poço para obtenção de cobertura de todas as regiões imunogênicas das proteínas estruturais do vírus HTLV-1 [região intermembrana de envelope (gp21), superfície de envelope (gp46) matriz (p19) e capsídeo (p24)]. Os ensaios foram combinados na proporção de 50 ng de cada antígeno em um mesmo poço, nas combinações Ag 2-2 + Ag 2-16 e Ag 2-5 + Ag 2-7 + 2-16. Para as combinações Ag 2-5 + Ag 2-14 + Ag 2-16 e Ag 2-5 + Ag 2-15 + Ag 2-16 o melhor desempenho obtido foi com a deposição de 20 ng de cada um dos antígenos por poço.

A combinação de multiantígenos Ag 2-2 + Ag 2-16 obteve a sensibilidade de 95,74%, identificando corretamente 90 amostras sorológicas positivas, entre as amostras negativas esta combinação identificou como falso-positivas 9 soros, resultando numa especificidade de 90,43%. A média de índice de reatividade das amostras positivas foi de 1,45 enquanto das amostras negativas foi de 0,80 (FIGURA 43 – A). Num total de 36 amostras apresentaram reatividade na faixa da zona cinza, sendo 28 amostras negativas e 8 amostras positivas.

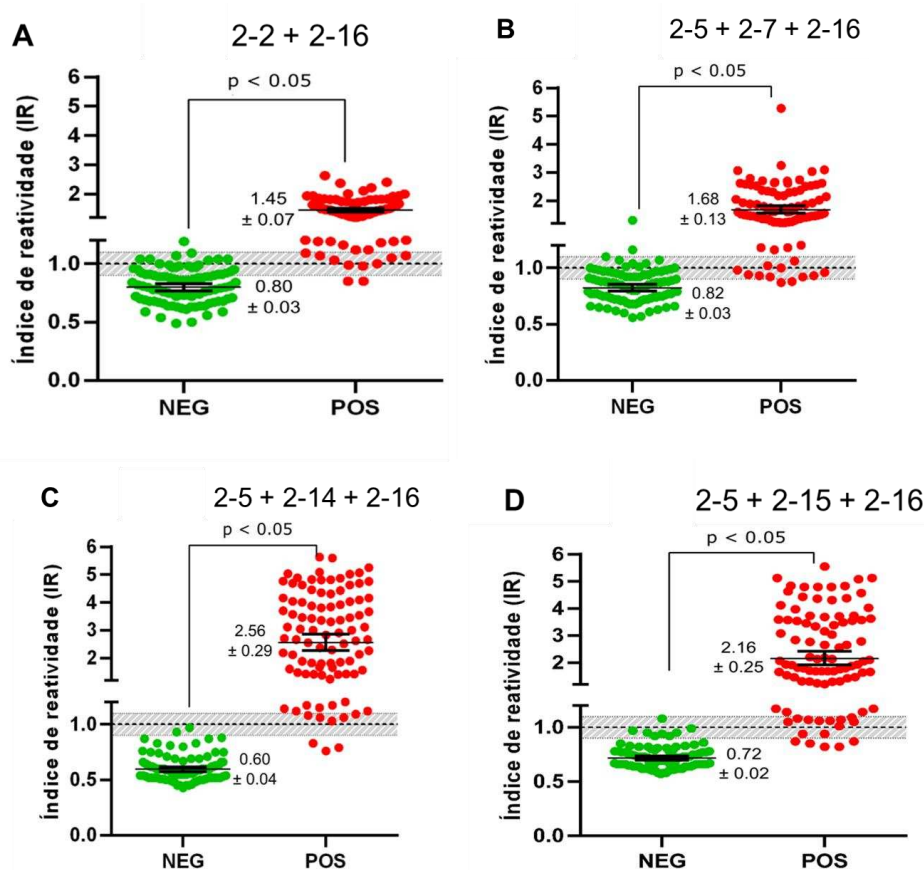
Analisando a combinação Ag 2-5 + Ag 2-7 + Ag 2-16 na FIGURA 43 – B observamos que esta combinação identificou 85 amostras positivas das 94 atingindo a sensibilidade de 90,43%. Esta combinação identificou como falso - positivas 11 amostras obtendo 88,30% de especificidade. A média de reatividade das amostras positivas para esta combinação foi de 1,68 e para as amostras negativas foi de 0,82. No total, 40 amostras apresentaram índice de reatividade na faixa da zona cinza, sendo 30 amostras negativas e 10 amostras positivas.

Ao avaliarmos a combinação dos antígenos Ag 2-5 + Ag 2-14 + Ag 2-16 observamos que esta combinação identificou 91 das 94 amostras positivas e não identificou nenhuma reação falso-positiva. Assim, a sensibilidade para este conjunto foi de 96,81% e especificidade de 100% (FIGURA 43 – C). A média de índice de reatividade das amostras positivas foi de 2,56 e para os soros

negativos foi de 0,60. Neste ensaio, o total de amostras na zona cinza foi o menor para todas os testes realizados em nosso trabalho, 2 amostras negativas e 5 amostras positivas.

Para a combinação Ag 2-5 + Ag 2-15 + Ag 2-16 a sensibilidade alcançada foi de 92,55% reconhecendo corretamente 87 amostras positivas, a especificidade foi de 98,94%. Analisando a FIGURA 43 – D observamos que a média de índice de reatividade das amostras positivas foi de 2,16 e para as amostras negativas foi de 0,72. Para esta combinação de antígenos, 19 amostras obtiveram índice de reatividade na faixa da zona cinza, sendo 8 amostras negativas e 5 amostras positivas.

FIGURA 43: ANÁLISE DO ÍNDICE DE REATIVIDADE NOS ENSAIOS COMBINADOS DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-1



Legenda: Avaliação do índice de reatividade dos antígenos recombinantes de HTLV-1 em combinações equimolares. A) antígenos Ag 2-2 + Ag 2-16; B) Antígenos Ag 2-5 + Ag 2-7 + Ag 2-16; C) Antígenos Ag 2-5 + Ag 2-14 + Ag 2-16; D) Antígenos Ag 2-5 + Ag 2-15 + Ag 2-16

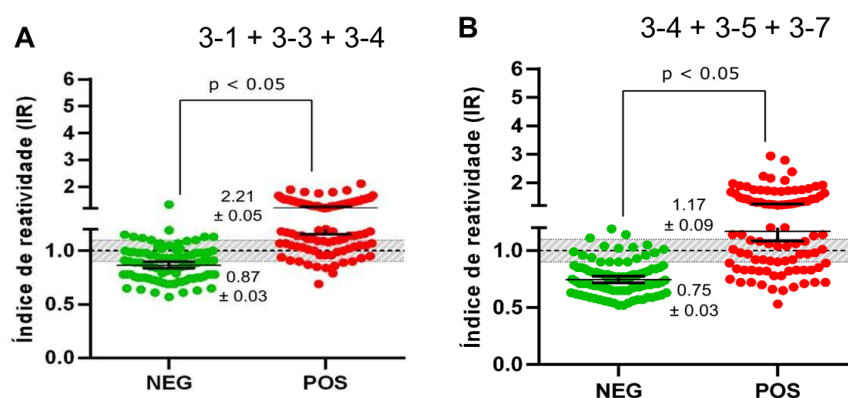
5.23 Avaliação do índice de reatividade dos ensaios imunológicos por ELISA realizados com combinações equimolares dos antígenos recombinantes de HTLV-2

Da mesma forma que avaliamos ensaios com multiantígenos de HTLV-1 realizamos combinações entre as proteínas recombinantes de HTLV-2 com 50 ng de antígeno por poço em cada combinação.

A combinação de antígenos Ag 3-1 + Ag 3-3 + Ag 3-4 identificou corretamente apenas 77 das amostras positivas (sensibilidade de 81,91%) e identificou como falso-positivas 19 amostras negativas (especificidade de 79,79%). Analisando o índice de reatividade na FIGURA 44 – A observamos a que média das amostras positivas foi de 2,21 e das amostras negativas foi de 0,87. Nesta combinação de antígenos observamos o maior número de amostras com índice de reatividade na faixa da zona cinza, foram 39 amostras negativas e 28 amostras positivas.

A combinação dos antígenos Ag 3-4 + Ag 3-5 + Ag 3-7 identificou corretamente apenas 58 das 94 amostras positivas (sensibilidade de 61,70%). Dentre as 94 amostras negativas identificou 8 amostras negativas como positivas (especificidade de 91,49%). Na FIGURA 44 – B, analisamos a média do índice de reatividade que foi de apenas 1,17 para as amostras positivas e 0,75 para as amostras negativas. Entre o conjunto de 188 amostras, 35 obtiveram índice de reatividade na faixa da zona cinza, sendo 15 amostras negativas e 20 amostras positivas.

FIGURA 44: ANÁLISE DO ÍNDICE DE REATIVIDADE NOS ENSAIOS COMBINADOS DOS ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE HTLV-2

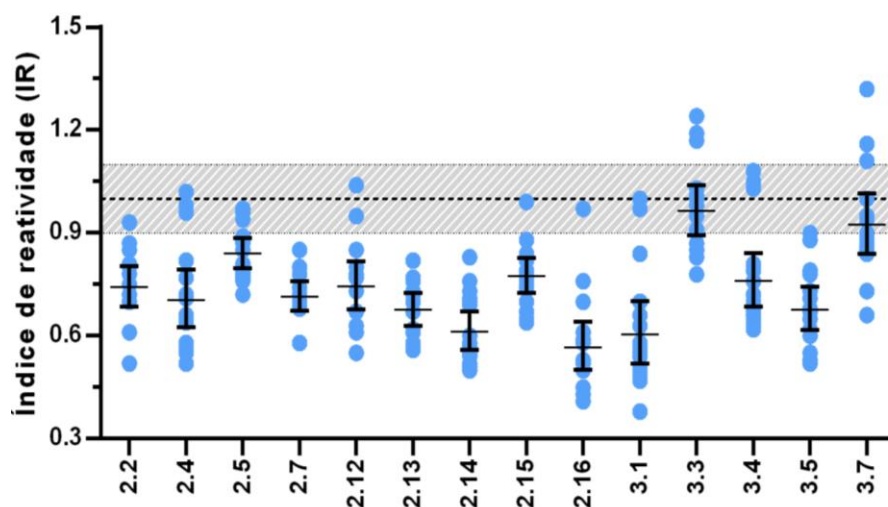


Legenda: Avaliação do índice de reatividade dos antígenos recombinantes de HTLV-1 em combinações equimolares. A) Antígenos Ag 3-1 + Ag 3-3 + Ag 3-4; B) Antígenos Ag 3-4 + Ag 3-5 + Ag 3-7.

5.24 Avaliação de reatividade cruzada com soros de HIV

Para avaliar a taxa de reação cruzada com soros de portadores de HIV, utilizamos 15 amostras positivas para HIV que são negativas para HTLV. As amostras foram cedidas pela Dra. Sandra Crestani do IBMP - Instituto de Biologia Molecular do Paraná. Estas amostras foram previamente testadas e compõem o painel AEQ – Avaliação externa de qualidade do Ministério da Saúde. Em paralelo incluímos 15 amostras positivas e 15 amostras negativas dos soros de HTLV provenientes da FIOCRUZ da Bahia já utilizados em nosso trabalho. O resultado desta avaliação do índice de reatividade é apresentado na FIGURA 45.

FIGURA 45: ANÁLISE GRÁFICA DO ÍNDICE DE REATIVIDADE DOS ANTÍGENOS DE HTLV-1 E 2 COM AMOSTRAS SÉRICAS POSITIVAS PARA HIV



Dentre os antígenos recombinantes de HTLV-1 avaliados, os antígenos Ag 2-2, Ag 2-7, Ag 2-13, Ag 2-14, Ag 2-15 e Ag 2-16 não apresentaram reatividade cruzada com os soros de pacientes portadores de HIV. Para os antígenos recombinantes de HTLV-2 apenas o antígeno Ag 3-5 não apresentou reatividade cruzada com as mesmas amostras. A média do índice de reatividade dos antígenos recombinantes de HTLV-1 variou entre 0,57 para o antígeno Ag 2-16 a 0,84 para o antígeno Ag 2-5. Já a média do índice do antígeno Ag 3-5 de HTLV-2 foi de 0,68.

Os antígenos recombinantes de HTLV-1 Ag 2-4 e Ag 2-12 apresentaram reatividade cruzada com amostras de soro positivas para HIV. Para os antígenos recombinantes de HTLV-2 a reatividade cruzada ocorreu com os antígenos Ag 3-1, Ag 3-3, Ag 3-4 e Ag 3-7. Embora os antígenos recombinantes que apresentaram reatividade cruzada tiveram uma média de índice de reatividade semelhante aos antígenos que não apresentaram reação cruzada, um soro positivo para HIV foi reconhecido erroneamente pelos antígenos Ag 2-4 e Ag 2-12 enquanto sete soros foram erroneamente diagnosticados usando os antígenos recombinantes de HTLV-2.

6. DISCUSSÃO

6.1 Produção proteínas estruturais de HTLV recombinantes em sistema procarioto

A expressão recombinante de proteínas de HTLV-1 em *E. coli* se mostrou uma eficiente estratégia, na qual obtivemos proteínas com alto rendimento. A produção recombinante em *E. coli* é bem estabelecida com uma vasta variedade de linhagens modificadas e plasmídeos de expressão o que torna este microrganismo uma plataforma ideal de expressão de proteínas heterólogas. Rosano, Germán L.; Ceccarelli (2014)

A sequência gênica exógena pode conter códons não muito utilizados por *E. coli*, denominados códons raros (Wada et al.,1992). Existe um potencial impedimento na expressão de proteínas recombinantes com base na taxa de códons raros, entretanto sequências gênicas podem ser analisadas e melhoradas. Assim, estes códons podem ser substituídos por códons sinônimos mais utilizados pela bactéria Makrides (1996 e Sharp; Li (1987). Os genes podem ser sintetizados no próprio laboratório ou como em nosso trabalho serem adquiridos de empresas de biotecnologia que sintetizam DNA com a taxa códon ideal para várias células hospedeiras de expressão.

As principais vantagens em se utilizar o sistema bacteriano de expressão são: expressão induzível, baixo custo, condições de cultura simples, crescimento rápido, escalonável, protocolos simples e vários parâmetros podem ser alterados para melhorar a expressão. A linhagem celular utilizada neste trabalho *E. coli* BL21 - Star (DE3) é amplamente utilizada na obtenção de antígenos recombinantes Jana; Deb (2005 e Kane (1995). A escolha do plasmídeo pET28 para expressão baseou-se na facilidade de clonagem dos genes de interesse com poli histidina tanto N- como C-terminal e na presença do gene *lacI* que permite maior inibição da transcrição basal na ausência do indutor IPTG. Sørensen; Mortensen (2005).

Os protocolos de expressão em *E. coli* BL21 - Star (DE3) usados neste trabalho mostraram ser eficientes, uma vez que permitiram a produção das proteínas recombinantes de HTLV-1 e 2 com elevado nível de expressão para maioria das construções, entretanto sob forma de corpos de inclusão para

maioria delas. A produção de proteínas recombinantes com elevados rendimentos em *E. coli* requer grande otimização das condições de expressão. A produção é ainda mais complexa para as proteínas que requerem modificações pós-traducionais como as ligações dissulfeto Ke; Berkmen (2014).

Por esta razão, existem muitas ferramentas moleculares e protocolos disponíveis para a produção em nível elevado de proteínas heterólogas, tais como um vasto catálogo de plasmídeos para expressão, e uma grande número de linhagens modificadas de *E. coli* Rosano, Germán L; Ceccarelli (2014).

A temperatura de indução também pode influenciar na solubilidade das proteínas, embora não tenhamos observado variação na solubilidade influenciada pela temperatura de expressão nos nossos testes. As alterações na temperatura de indução podem influenciar a taxa de alongamento da cadeia polipeptídica, consequentemente alongar a cadeia polipeptídica para formar domínios estruturais ordenados. A redução da temperatura de indução, muitas vezes tem um efeito positivo sobre a solubilidade, atribuído à ação mais lenta de alongação da cadeia polipeptídica, entretanto nos testes de expressão em baixas temperaturas realizados em nosso trabalho, expressão de proteínas nas temperaturas de 15°C e 25°C não influenciaram na solubilidade e aumento nos níveis de expressão das proteínas Lebendiker; Danieli (2014 e Vasina; Baneyx (1997).

A recuperação de proteínas nativas a partir de agregados em corpos de inclusão citoplasmáticos em *E. coli* é um obstáculo na produção de proteínas recombinantes, tanto para finalidade de pesquisa quanto para a produção industrial. Os processos tradicionais de desnaturação das proteínas nos agregados utilizando-se altas concentrações de agentes caotrópicos seguido de renaturação geralmente levam a baixos rendimentos de proteínas nativas, pois as porcentagens de reagregação frequentemente são altas Dias (2008). Entretanto, para a solubilização dos antígenos Ag 2-2, 2-5, 2-7, 2-14 de HTLV-1 e Ag 3-1, 3-5 e 3-7 de HTLV-2 a desnaturação com adição de ureia mostrou-se bastante eficiente.

O correto dobramento da proteína e sua forma biologicamente ativa podem ser obtidos a partir dos corpos de inclusão. Primeiramente é necessário a desnaturação, seguida de renaturação *in vitro*. Para este feito podemos

adicionar agentes desnaturantes como: ureia ou cloreto de guanidina Jevševar et al. (2008 e Tsumoto et al. (2003). Estes agentes caotrópicos causam o desdobramento na estrutura das proteínas. A renaturação (*refolding*) pode ser obtida diminuindo gradativamente a concentração do agente desnaturante, empregando diálise e etapas de cromatografia. Por ser demasiadamente demorado e resultar em baixo rendimento, este processo nem sempre é recomendado, principalmente por representar passos adicionais no processo industrial na produção de proteínas de interesse clínico Phan et al. (2011). Para as proteínas obtidas em condição desnaturante, não utilizamos etapas de *refolding*, estas proteínas foram armazenadas e submetidas aos ensaios imunológicos na forma desnaturada.

A produção de antígenos em forma de quimeras desenvolvidas em nosso trabalho simplificou o processo de produção de variadas regiões antigênicas em uma mesma proteína. A preparação individual de antígenos de HTLV-1 é demorada e dispendiosa. O uso de antígenos quiméricos substitui a expressão separada de proteínas e reduz o custo de produção Heydari-Zarnagh et al. (2015).

A purificação de proteínas é a base central nos estudos que envolvem as pesquisas biotecnológicas. A adição de etiquetas de captura continua sendo uma alternativa rápida, econômica e eficiente Lin et al. (2015). A fusão com etiquetas também favorece uma ferramenta útil no estudo das interações proteína-proteína, uma das etiquetas fusionadas mais amplamente utilizadas é a hexa histidina (6xHis). Estas etiquetas, podem interagir com cátions metálicos imobilizados para fornecer a captura de proteínas e complexos proteicos de interesse Puckett (2015).

A purificação por afinidade realizada com as proteínas recombinantes de HTLV-1 e 2 se mostrou altamente eficiente, visto que apenas neste método de purificação obtivemos proteínas com grau de pureza satisfatório para aplicação em ensaios imunológicos por ELISA.

6.2 Potencial dos antígenos recombinantes para imunodiagnóstico de HTLV-1 e 2

A controvérsia sobre a eficiência nos testes diagnósticos para infecção de HTLV-1 e HTLV-2 são constantes. Baixa especificidade nos testes diagnósticos são observadas em kits que possuem lizado viral e proteínas recombinantes como antígenos. Mesmo os kits de 3ª geração não obtém 100% de especificidade na relação HTLV-1 e 2, o que demanda sempre um segundo teste confirmatório Jacob et al. (2007). O diagnóstico do HTLV-1 está em constante evolução, desde os primeiros testes com resultados de baixa especificidade que foram reduzidos graças aos avanços em técnicas de ensaio que se aplicam antígenos específicos Ishihara et al. (2014).

Os kits diagnósticos desenvolvidos com peptídeos recombinantes e sintéticos são mais específicos quando comparados com kits compostos por lizado viral Qiu et al. (2008 e Vrielink et al. (1999). As proteínas antigênicas baseadas no envelope, matriz e capsídeo de HTLV-1 e 2 atendem a regulamentação brasileira para triagem e teste confirmatório aplicados aos testes de diagnóstico Brasil (2016 e Ministério da Saúde do Brasil (2004 e Saúde (2013 e SAÚDE (2016).

Nos retrovírus de modo geral, a proteína estrutural de capsídeo p24 é a principal responsável pela biogênese das partículas virais. No vírus HIV-1, por exemplo, o domínio C terminal é o principal determinante das interações Gag-Gag, já no vírus HTLV-1 o domínio N terminal fornece contribuições distintas para a oligomerização de Gag-Gag Martin, Jessica L et al. (2017). Desta forma a proteína p24 de HTLV-1 pode ser expressa em forma de oligômeros distintos dos domínios N ou C terminal para obtenção de monômeros solúveis desta proteína.

Muitas proteínas, domínios ou peptídeos diferentes podem ser fundidos com a proteína alvo. As vantagens da utilização de proteínas de fusão para facilitar a purificação e a detecção de proteínas recombinantes são bem reconhecidas Terpe (2003). As construções quiméricas baseadas na fusão com o domínio C-terminal da proteína de capsídeo p24 permaneceram solúveis quando comparadas com as construções em que adicionamos a proteína de capsídeo completa. As regiões de proteínas de envelope e matriz utilizadas

nestas fusões basearam-se em peptídeos descritos como imunogênicos Bocalandro et al. (2004 e Guerra et al. (2018 e Hernández Marin et al. (2003 e Hernández Marin, M et al. (2001 e Marin et al. (2005 e Martin, Jessica L. et al. (2017 e Meissner et al. (2017 e Rayne et al. (2002).

6.3 Desempenhos dos ensaios imunológicos com misturas de antígenos

O uso combinado de dois ou mais antígenos em ensaios imunoenzimáticos é frequente no diagnóstico de diversas patologias Baschiroto et al. (2017 e Crestani et al. (2016 e Fonseca et al. (2011 e Foti et al. (2009). Assim determinamos ensaios por ELISA com a combinação dos antígenos de HTLV de modo que em cada ensaio estivessem presentes regiões imunogênicas das proteínas estruturais p24, gp21, gp46 e p19. Para a combinação Ag 2-2 + Ag 2-16, a sensibilidade alcançada foi de 95,7% e a especificidade de 90,43%. Embora o desempenho desta combinação tenha sido superior ao alcançado pelo antígeno Ag 2-16 testado sozinho, o resultado foi inferior ao obtido apenas com o antígeno Ag 2-2, que alcançou a sensibilidade de 98,9% e especificidade de 95,74%.

A melhora no desempenho dos antígenos testados em mistura não foi observada nas combinações Ag 2-5 + Ag 2-7 + Ag 2-16 e Ag 2-5 + Ag 2-15 + Ag 2-16. Entretanto na combinação Ag 2-5 + Ag 2-14 + Ag 2-16, observamos que a especificidade alcançada foi de 100%, este resultado não foi obtido com nenhum dos antígenos testados isoladamente. Este fato ressalta que o uso de antígenos combinados deve ser avaliado levando-se em conta qual o critério de desempenho é mais relevante para determinada população de amostras.

Os ensaios combinados com os antígenos Ag 3-1 + Ag 3-3 + Ag 3-4 de HTLV-2 a sensibilidade foi de 81,91% e a especificidade de 79,79%. No ensaio com a combinação Ag 3-4 + Ag 3-5 + Ag 3-7 também de HTLV-2 a sensibilidade obtida foi de 61,7% e a especificidade de 91,49%. Ambos os resultados foram inferiores ao desempenho alcançado pelos antígenos recombinantes de HTLV-2 testados isoladamente. Este resultado pode estar relacionado com a possibilidade de antígenos individuais competirem uns com os outros pelos

sítios de ligação, acarretando na diminuição da sensibilidade e especificidade Kenny; Dunsmoor (1983).

6.4 Amostras da zona cinza

A zona cinza foi definida como $\pm 10\%$ da linha de corte, ou seja, com índice de reatividade de 0.90 a 1.10. De modo geral, a quantidade de amostras na zona cinza foi bastante elevada, em especial no conjunto de soros negativos. O fato de as amostras negativas apresentarem índice de reatividade elevados pode estar relacionado com a etapa de padronização ineficiente.

Uma das grandes dificuldades enfrentadas em nosso trabalho se trata da obtenção de amostras sorológicas previamente qualificadas, tanto em quantidade de soros quanto em volume de amostras. A etapa de padronização de ensaios imunológicos requer uma ampla testagem e por consequência um elevado consumo destas amostras. Portanto, limitamos a testagem de um único antígeno como modelo para os ensaios e restringimos os parâmetros de testagem.

Para o ensaio de padronização, utilizamos o antígeno Ag 2-5 (p24 + gp21) visto que o perfil de anticorpos das amostras sorológicas é desconhecido. E entre os antígenos avaliados o antígeno Ag 2-5 apresentou menor percentagem de amostras na zona cinza.

Outro fator relevante baseia-se na conservação das amostras, sucessivos congelamentos e descongelamentos e a estocagem prolongada dos soros que podem ocasionar reações inespecíficas nos ensaios por ELISA Lal (1996).

6.5 Reatividade cruzada com soros de portadores de HIV

Num estudo com amostras indeterminadas por Western Blot para sorologia de HIV e HTLV-1/2 GASTALDELLO et al., (2001) sugerem que amostras indeterminadas apresentam reação cruzada entre as proteínas de HIV-1 e HTLV-1 e 2.

A reação cruzada com amostras de portadores de HIV ocorreu em uma amostra sorológica para os antígenos Ag 2-4 e Ag 2-12 de HTLV-1. De acordo

com Rasuli et al. (1995) os peptídeos 100 a 130 de p19, 376 a 392 e 381 a 400 de gp21 de HTLV-1, podem apresentar reatividade cruzada com 3 a 54% dos soros de HIV-1. O antígeno Ag 2-12 compreende a região 330 a 421 da proteína gp21 de HTLV-1.

Entre os antígenos de HTLV-2 apenas o antígeno Ag 3-5 não apresentou reação cruzada, ao todo 7 das 15 amostras de soros positivas para HIV reagiram de forma errônea com os antígenos Ag 3-1, Ag 3-3, Ag 3-4 e Ag 3-7 de HTLV-2.

6.6 Ensaios imunológicos por ELISA

A detecção da infecção pelo vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) baseia-se principalmente na sorologia, entretanto diferentes métodos podem ser utilizados. Embora os testes atuais tenham alta sensibilidade e especificidade, em regiões de baixa prevalência, um número significativo de reações falso-positivas ocorre Campos et al. (2017 e Tosswill; Taylor (2018).

A adequada avaliação de desempenho de um teste diagnóstico deve ser realizada por meio da determinação de parâmetros de desempenho frente a uma amostragem representativa, avaliação dos ensaios de reprodutibilidade e verificação de reação cruzada com outros patógenos. No entanto comparar antígenos em desenvolvimento com o desempenho de kits comerciais disponíveis representa um desafio e por vezes um demérito dos insumos em fase inicial de pesquisa. Kits de diagnóstico comerciais já passaram por etapas de aprovação por órgãos regulatórios e seu desempenho já foi comprovado em amostras com sorologia desconhecida Santos (2016 e Vray (2015). Apesar disso, buscamos comparar o desempenho atingido pelos antígenos desenvolvidos em nosso trabalho com objetivo de verificar se nossos antígenos possuem desempenho semelhante aos kits de imunodiagnóstico já estabelecidos.

Num estudo comparativo entre sete sistemas de diagnóstico de HTLV-1 e HTLV-2 o melhor desempenho obtido foi em testes realizados com os kits Roche Diagnostics, Abbott Architect rHTLV I/II, Abbott Prisma HTLV-I/HTLV-II e

Abbot Elecsys HTLV-I / II, a sensibilidade alcançada nestes testes foi de 100% enquanto que a especificidade foi de 99,83% (LAPERCHE et al., 2017; CAMPOS et al., 2017).

Na Argentina foi realizado estudo comparativo com quatro kits comerciais incluindo o teste de aglutinação Serodia HTLV-1 (Fujirebio, Toquio, Japão) e três testes baseados em ELISA, incluindo BioELISA (HTLV-1+2, BioKit, Barcelona, Espanha), Vironostika (HTLV-1/2, bioMerieux, Boxtel, Holanda) e Murex (HTLV-1+2, Murex Diagnostics, Dartford, Inglaterra). O ensaio mais sensível para HTLV-1/2 foi Fujirebio Biokit (98,6%) seguido por Murex (97,2%) e Vironostika (96,5%). O mais específico foi Murex (99,7%), seguido por Biokit (97,0%), Fujirebio (95,8%), e Vironostika (92,9%) Berini et al. (2008). Estes valores de sensibilidade e especificidade encontram-se numa faixa abaixo do ideal que seria de $\geq 99\%$ Berini et al. (2008).

Comparando o desempenho dos antígenos aqui produzidos verificamos que o EIA Retrovírus ROCHE obteve resultados bastante semelhantes: especificidade de 99,16% e sensibilidade de 97,56% em amostras sorológicas de doadores de sangue Dobec et al. (1993)

Um estudo comparativo entre as técnicas de *Western Blot* e PCR desenvolvido no Instituto Adolfo Lutz demonstrou que a técnica de PCR possui melhor relação custo benefício que o *Western Blot* na detecção da infecção pelo HTLV-1/2, entretanto esta técnica não está disponível em todos os serviços de saúde tornando assim o *Western Blot* uma metodologia complementar no diagnóstico confirmatório da infecção pelo HTLV-1 e 2 Avelar et al. (2011 e Costa et al. (2011).

A realização dos ensaios sorológicos por ELISA demonstrou o valioso potencial das construções antigênicas aqui propostas. Entre os antígenos destinados a triagem sorológica para HTLV-1 apenas o antígeno Ag 2-16 apresentou baixa sensibilidade (88,3%), entretanto a especificidade para este antígeno foi de 97,8%. O antígeno Ag 2-14 apresentou sensibilidade de 100 % e especificidade de 98,4%. Em geral os antígenos recombinantes produzidos neste trabalho apresentaram um alto desempenho, em destaque as construções Ag 2-5 e 2-14 (TABELA 8). Entre os antígenos recombinantes de HTLV-2 destaca-se o antígeno Ag 3-5 baseado na construção quimérica (p24 de HTLV-2 em fusão com gp21 de HTLV-1) que obteve sensibilidade de 100%

e especificidade de 95,7% (TABELA 9). Mesmo quando comparados com ensaios comerciais automatizados o conjunto de antígenos aqui produzidos demonstra grande potencial de aplicação em triagem sorológica em bancos de sangue e rede de assistência básica a saúde.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O planejamento das construções genéticas para expressão dos antígenos foi realizado a partir de sequências aminoacídicas de proteínas inteiras e regiões antigênicas já mapeadas atendendo as diretrizes da portaria nº158 de 2016 da ANVISA que regulamenta a triagem sorológica de HTLV em procedimentos seroterápicos.

- Avaliamos o grau de conservação das sequências aminoacídicas das proteínas estruturais dos vírus HTLV-1 e 2 e evidenciamos que a divergência entre isolados do mesmo vírus é baixa, não necessitando assim de múltiplas construções para um mesmo antígeno.

- A estratégia de fusão das proteínas insolúveis a proteínas solúveis mostrou-se eficiente. Avaliamos a expressão de regiões imunogênicas das proteínas de envelope (insolúveis) fusionadas ao domínio C-terminal (solúvel) da proteína de capsídeo. Estas construções quiméricas foram expressas na forma solúvel e com bom rendimento.

- Os antígenos planejados foram expressos com sucesso em sistema procarioto. Mesmo as proteínas expressas sob forma de corpos de inclusão puderam ser obtidas em condições desnaturantes, purificadas e avaliadas em ensaios imunológicos por ELISA.

- A avaliação do desempenho do conjunto de antígenos demonstrou o alto potencial deste conjunto para aplicação em sistemas de triagem e diagnóstico confirmatório da infecção pelo HTLV-1, de modo geral a sensibilidade da maioria dos antígenos foi superior a 95% e a especificidade superior a 90%.

- Mesmo não podendo realizar o diagnóstico diferenciado entre HTLV-1 e 2 devido à falta de amostras genotipadas, as construções antigênicas destinadas ao diagnóstico de HTLV-2 obtiveram um bom desempenho, em destaque o antígeno Ag 3-5 com sensibilidade de 100% e especificidade de 95,7%. Isso demonstra que mesmo não havendo discriminação entre os

subtipos, este antígeno possui excelente desempenho para triagem de amostras infectadas pelo HTLV-1 e/ou 2.

- Diferente do esperado, os ensaios com múltiplos antígenos aqui avaliados não resultaram no aumento da sensibilidade, entretanto é uma metodologia que pode ser otimizada visto que permitirá uma maior cobertura de regiões antigênicas e corresponder a variedade de amostras sorológicas, principalmente em regiões não endêmicas.

- A avaliação de reatividade com amostras de HIV-1 demonstrou significativa especificidade dos antígenos de HTLV-1, apenas 1 soro apresentou reação cruzada, entretanto entre os antígenos de HTLV-2 a reação cruzada ocorreu em maior frequência.

8. REFERÊNCIAS

- AJIRO, M.; ZHENG, Z.-M. Oncogenes and RNA splicing of human tumor viruses. **Emerging microbes & infections**, v. 3, n. 9, p. e63, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4185361&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/10/2015.
- ANDERSSON, S.; THORSTENSSON, R.; RAMIREZ, K. G.; et al. Comparative evaluation of 14 immunoassays for detection of antibodies to the human T-lymphotropic virus types I and II using panels of sera from Sweden and West Africa. **Transfusion**, v. 39, n. 8, p. 845–851, 1999. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111). Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1537-2995.1999.39080845.x>>. Acesso em: 3/7/2019.
- ARAUJO, A. Q.-C. Update on Neurological Manifestations of HTLV-1 Infection. **Current infectious disease reports**, v. 17, n. 2, p. 459, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25787112>>. Acesso em: 22/3/2015.
- AVELAR, E.; COSTA, S.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; et al. Edição 94. , v. 8, n. 94, p. 4–15, 2011.
- BANGHAM, C. R. M. Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 43–71, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29144838>>. Acesso em: 30/1/2019.
- BARBEAU, B.; MESNARD, J.-M. Does chronic infection in retroviruses have a sense? **Trends in microbiology**, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25701112>>. Acesso em: 22/3/2015.
- BARRETO, F. K.; ARAÚJO, T. H. A.; REGO, F. F. DE A.; et al. A Fully Annotated Genome Sequence of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1). , 2017. Desconhecida. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/21100>>. Acesso em: 5/8/2019.
- BASCHIROTTI, P. T.; KRIEGER, M. A.; FOTI, L. Preliminary multiplex microarray IgG immunoassay for the diagnosis of toxoplasmosis and rubella. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 6, p. 428–436, 2017. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762017000600428&lng=en&tling=en>. Acesso em: 16/7/2019.
- BENDER, C.; RENDE, F.; COTENA, A.; et al. Temporal regulation of HTLV-2 expression in infected cell lines and patients: evidence for distinct expression kinetics with nuclear accumulation of APH-2 mRNA. **Retrovirology**, v. 9, p. 74, 2012.

Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3468393&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/3/2015.

BERINI, C. A.; PASCUCCHIO, M. S.; BAUTISTA, C. T.; et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell Lymphotropic virus types 1 and 2. , v. 147, p. 322–327, 2008.

BOCALANDRO, Y. M.; MARIN, M. H.; VALLEJO, R. A. V.; et al. Antigenic mixture of synthetic peptides for the immunodiagnosis of HTLV I/II infection. **Journal of immunoassay & immunochemistry**, v. 25, n. 3, p. 205–14, 2004. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15461383>>. Acesso em: 11/3/2015.

BRASIL, M. DA S.-S. DE V. EM S. Pré Natal e puerpério: Atenção qualificada e humanizada. Disponível em:
<http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_pre_natal_puerperio_3ed.pdf>. Acesso em: 24/3/2015.

BRASIL, M. DA S.-S. DE V. EM S. Resolução RDC nº 57, de 16 de dezembro de 2010. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/fd337280474597529fcbdf3fbc4c6735/RDC_nº_57.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 24/3/2015.

BRASIL, M. DA S.-S. DE V. EM S. Atenção ao pré-natal de baixo risco. Disponível em:
<http://189.28.128.100/dab/docs/portaldab/publicacoes/caderno_32.pdf>. Acesso em: 24/3/2015.

BRASIL, M. DA S.-S. DE V. EM S. **RDC nº 72 de 2016 Regulamento técnico para o funcionamento dos Bancos de Células e Tecidos Germinativos**. 2016.

CAMPOS, K. R.; GONÇALVES, M. G.; COSTA, N. A.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 297–305, 2017. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28343818>>. Acesso em: 23/7/2019.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; AMARANTO-DAMASIO, M. S.; LEAL-HORIGUCHI, C. F.; et al. Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 3, n. Suppl 1, p. S24–S29, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25232474>>.

Acesso em: 25/2/2015.

CASSAR, O.; GESSAIN, A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1582, p.3–24, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28357658>>. Acesso em: 23/7/2019.

CASTRO FILHO, B. G.; ALCANTARA, L. C. J.; GRASSI, M. F. R.; et al. Epidemiologia e origem do HTLV-I em Salvador Estado da Bahia: a cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. **Gaz. méd. Bahia**, v. 79:1(Jan-D, 2009. Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. DE F.; PROIETTI, F. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 21, n. 3, p. 926–31, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15868051>>. Acesso em: 10/3/2015.

CAVALLARI, I.; RENDE, F.; BENDER, C.; et al. Fine tuning of the temporal expression of HTLV-1 and HTLV-2. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 235, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3759025&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/3/2015.

CIMINALE, V.; RENDE, F.; BERTAZZONI, U.; ROMANELLI, M. G. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 398, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4114287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/3/2015.

COONROD, D. V.; JACK, B. W.; STUBBLEFIELD, P. G.; et al. The clinical content of preconception care: infectious diseases in preconception care. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 199, n. 6 Suppl 2, p. S296-309, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19081424>>. Acesso em: 24/3/2015.

COSTA, E. A. S.; MAGRI, M. C.; CATERINO-DE-ARAUJO, A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. **Journal of virological methods**, v. 173, n. 2, p. 280–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349293>>. Acesso em: 23/3/2015.

COSTA, S.; ALMEIDA, A.; CASTRO, A.; DOMINGUES, L. Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: the novel Fh8 system. **Frontiers in microbiology**, v. 5, p. 63, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3928792&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 31/7/2015.

COUTINHO, R.; GRASSI, M. F. R.; KORNGOLD, A. B.; et al. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load induces activation of T-lymphocytes in asymptomatic carriers. **BMC infectious diseases**, v. 14, p. 453, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4148537&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/3/2015.

CRESTANI, S.; LEITOLIS, A.; LIMA, L. F. O.; KRIEGER, M. A.; FOTI, L. Enhanced target-specific signal detection using an Escherichia coli lysate in multiplex microbead immunoassays with E. coli-derived recombinant antigens. **Journal of immunological methods**, v. 435, p. 17–26, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27156997>>. Acesso em: 15/10/2019.

DAVI, E. V. **Clonagem de fragmentos dos genes gag e env do HIV-1 e HTLV-1, expressão em Escherichia coli das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 e imunodeteção**, 15. abr. 2015. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-01072015-103417/>>.

Acesso em: 16/7/2019.

DIAS, L. E. M. F. Estudos de renaturação em alta pressão hidrostática de proteínas agregadas em corpos de inclusão citoplasmáticos produzidos em Escherichia coli. , 2008.

DOBEC, M.; JUNG, M.; ZUPANČIĆ-SALEK, S.; et al. [The combined immunoenzyme test: anti-HIV-1 and -2 and anti-HTLV-1 in the detection of donors with retrovirus infections]. **Lijecnicki vjesnik**, v. 115, n. 5–6, p. 142–5, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8302133>>. Acesso em: 23/7/2019.

VAN DOOREN, S. J. A. Molecular investigation of the evolutionary history and diversity of primate T-lymphotropic virus types 1 and 3. Disponível em: <<https://lirias.kuleuven.be/bitstream/123456789/130003/1/thesisSVDfinalprintver>>.

Acesso em: 11/3/2015.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, p. 1792–1797, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15034147>>. Acesso em: 30/10/2017.

FAATZ, E.; SCHOLZ, C.; MUENCH, P. Soluble And Immunoreactive Variants Of Htlv Capsid Antigen P24. **049-828-925-714-08X**, v. US, n. 19, p. A1, 2017. Disponível em:

<<https://lens.org/049-828-925-714-08X>>. .

FARAMARZI, R.; DOLATABADI, S. Expression and purification of recombinant HTLV-I/II linear epitopes antigen and its application for screening of suspected patients. **Iranian journal of microbiology**, v. 9, n. 1, p. 43–49, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28775823>>. Acesso em: 11/7/2019.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; SENEFONTE, F. R. DE A.; LOPES, A. H. A.; et al. Frequência das infecções pelo HIV-1, rubéola, sífilis, toxoplasmose, citomegalovírus, herpes simples, hepatite B, hepatite C, doença de Chagas e HTLV I/II em gestantes, do Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 181–187, 2007. SBMT. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822007000200007&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 24/3/2015.

DE FLORA, S.; LA MAESTRA, S. Epidemiology of cancers of infectious origin and prevention strategies. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 56, n. 1, p. E15-20, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26789827>>. Acesso em: 27/10/2017.

FONSECA, B. P. F.; MARQUES, C. F. S.; NASCIMENTO, L. D.; et al. Development of a multiplex bead-based assay for detection of hepatitis C virus. **Clinical and vaccine immunology: CVI**, v. 18, n. 5, p. 802–6, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21346054>>. Acesso em: 15/10/2019.

FOTI, L.; FONSECA, B. DE P. F. E; NASCIMENTO, L. D.; et al. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Supl 1, p. 136–41, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753468>>. Acesso em: 15/10/2019.

FOX, J. M.; MUTALIMA, N.; MOLYNEUX, E.; et al. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 amongst mothers and children in Malawi within the context of a systematic review and meta-analysis of HTLV seroprevalence in Africa. **Tropical medicine & international health: TM & IH**, v. 21, n. 3, p. 312–24, 2016. Wiley-Blackwell. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26700941>>. Acesso em: 22/7/2019.

FUZII, H. T.; DA SILVA DIAS, G. A.; DE BARROS, R. J. S.; FALCÃO, L. F. M.; QUARESMA, J. A. S. Immunopathogenesis of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Life sciences**, v. 104, n. 1–2, p. 9–14, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24704970>>. Acesso em: 22/3/2015.

GADELHA, C. A. G.; COSTA, L. Integração de fronteiras: a saúde no contexto de uma política nacional de desenvolvimento. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. S214–S226, 2007. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2007001400011&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 24/3/2015.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L. G.; et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242–3, 1997. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9051104>. Acesso em: 11/3/2015.

GASTALDELLO, R.; GALLEGGO, S.; ISA, M. B.; et al. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV-I/II in Cordoba, Argentina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 43, n. 5, p. 277–282, 2001. Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 388, 2012. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23162541>. Acesso em: 5/3/2015.

GIAM, C.-Z.; SEMMES, O. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma—A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 161, 2016. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1999-4915/8/6/161>. Acesso em: 15/11/2016.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Isolation and Quantification of DNA. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2018, n. 6, p. pdb.top093336, 2018. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29858343>. Acesso em: 22/9/2019.

GROSS, C.; WIESMANN, V.; MILLEN, S.; et al. The Tax-Inducible Actin-Bundling Protein Fascin Is Crucial for Release and Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). **PLoS pathogens**, 2016.

GRUNBERG-MANAGO, M. Messenger RNA Stability and Its Role in Control of Gene Expression in Bacteria and Phages. **Annual Review of Genetics**, v. 33, n. 1, p. 193–227, 1999. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genet.33.1.193>. Acesso em: 22/9/2019.

GUERRA, A. B.; SIRAVENHA, L. Q.; LAURENTINO, R. V.; et al. Seroprevalence of

HIV, HTLV, CMV, HBV and rubella virus infections in pregnant adolescents who received care in the city of Belém, Pará, Northern Brazil. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 18, n. 1, p. 169, 2018. Disponível em: <<https://bmcpregnancychildbirth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12884-018-1753-x>>. Acesso em: 8/7/2019.

HALL, W. W.; ISHAK, R.; ZHU, S. W.; et al. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association**, v. 13 Suppl 1, p. S204-14, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797725>>. Acesso em: 27/10/2017.

HANAHAN, D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 1983. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283683802848>>. Acesso em: 16/9/2014.

HERNÁNDEZ, M.; SELLES, M. E.; POZO PEA, L.; GÓMEZ, I.; MELCHOR, A. Antigenicity of chimeric synthetic peptides based on HTLV-1 antigens and the impact of epitope orientation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, n. 3, p. 1085–1088, 2000. Academic Press Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11027594/>>. Acesso em: 6/7/2020.

HERNÁNDEZ MARIN, M; CASTELLANOS PENTÓN, P.; MÁRQUEZ BOCALANDRO, Y.; et al. Chimeric synthetic peptides containing two immunodominant epitopes from the envelope gp46 and the transmembrane gp21 glycoproteins of HTLV-I virus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 1, p. 1–6, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11708767>>. Acesso em: 11/7/2019.

HERNÁNDEZ MARIN, MILENEN; CASTELLANOS PENTÓN, P.; MÁRQUEZ BOCALANDRO, Y.; et al. Chimeric synthetic peptides from the envelope (gp46) and the transmembrane (gp21) glycoproteins for the detection of antibodies to human T-cell leukemia virus type II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, n. 1, p. 7–12, 2001b. Academic Press Inc. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11708768/>>. Acesso em: 8/7/2020.

HERNÁNDEZ MARIN, M.; MÁRQUEZ BOCALANDRO, Y.; VÁZQUEZ VALLEJO, R.; et al. Use of a Chimeric Synthetic Peptide from the Core p19 Protein and the Envelope gp46 Glycoprotein in the Immunodiagnosis of HTLV-II Virus Infection. **Preparative**

Biochemistry and Biotechnology, 2003.

HEYDARI-ZARNAGH, H.; HASSANPOUR, K.; RASAEI, M. Constructing Chimeric Antigen for Precise Screening of HTLV-I Infection. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, v. 14, n. 4, p. 427–436, 2015.

HIALLA, T.; ARAUJO, A.; BARRETO, F. K.; et al. Inferences about the global scenario of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection using data mining of viral sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 109, n. 4, p. 448–451, 2014.

HORAL, P.; HALL, W. W.; SVENNERHOLM, B.; et al. Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp46 and gp21 of human T-cell leukemia viruses type I and type II using synthetic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 13, p. 5754, 1991. National Academy of Sciences. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1712105>>. Acesso em: 5/7/2019.

ISHAK, R.; VALLINOTO, A. C. R.; AZEVEDO, V. N.; ISHAK, M. DE O. G. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 901–914, 2003. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2003000400013&lng=en&tling=en>. Acesso em: 30/10/2017.

ISHIHARA, K.; INOKUCHI, N.; TSUSHIMA, Y.; et al. Relevance of molecular tests for HTLV-1 infection as confirmatory tests after the first sero-screening. **Journal of immunoassay & immunochemistry**, v. 35, n. 1, p. 74–82, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24063618>>. Acesso em: 8/11/2015.

JACOB, F.; SANTOS-FORTUNA, E. DE LOS; AZEVEDO, R. S.; CATERINO-DE-ARAÚJO, A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 361–364, 2007. Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652007000600005&lng=en&nrm=iso&tling=en>. Acesso em: 8/11/2015.

JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 289–98, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15635462>>. Acesso em: 30/7/2014.

JEVŠEVAR, S.; GABERC-POREKAR, V.; FONDA, I.; et al. Production of Nonclassical Inclusion Bodies from Which Correctly Folded Protein Can Be Extracted. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 632–639, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1021/bp0497839>>. Acesso em: 21/11/2016.

KANE, J. F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 494–500, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7579660>>. Acesso em: 27/9/2014.

KE, N.; BERKMEN, M. Production of Disulfide-Bonded Proteins in *Escherichia coli*. **Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]**, v. 108, p. 16.1B.1–16.1B.21, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271713>>. Acesso em: 8/11/2015.

KENNY, G. E.; DUNSMOOR, C. L. Principles, problems, and strategies in the use of antigenic mixtures for the enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of clinical microbiology**, v. 17, n. 4, p. 655–65, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6343423>>. Acesso em: 15/10/2019.

KHORASANIZADEH, S.; CAMPOS-OLIVAS, R.; SUMMERS, M. F. Solution structure of the capsid protein from the human T-cell leukemia virus type-1. **Journal of Molecular Biology**, 1999.

KITAGAWA, T.; FUJISHITA, M.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I.; TADOKORO, H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **JAMA**, v. 256, n. 17, p. 2342, 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2877100>>. Acesso em: 11/3/2015.

LAL, R. B. Delineation of immunodominant epitopes of human T-lymphotropic virus types I and II and their usefulness in developing serologic assays for detection of antibodies to HTLV-I and HTLV-II. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association**, v. 13 Suppl 1, p. S170-8, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8797720>>. Acesso em: 16/10/2019.

LAPERCHÉ, S.; LEFRÈRE, J.-J.; MOREL, P.; POUCHOL, E.; POZZETTO, B. [Blood transfusion: Control of infectious risks]. **Presse médicale (Paris, France : 1983)**, v. 44, n. 2, p. 189–99, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25547992>>. Acesso em: 16/2/2015.

LAPERCHÉ, S.; PILLONEL, J. [Relevance of safety measures to avoid HTLV

transmission by transfusion in 2014]. **Transfusion clinique et biologique : journal de la Société française de transfusion sanguine**, v. 21, n. 4–5, p. 167–72, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25267203>>. Acesso em: 2/11/2015.

LEBENDIKER, M.; DANIELI, T. Production of prone-to-aggregate proteins. **FEBS letters**, v. 588, n. 2, p. 236–46, 2014. Elsevier. Disponível em: <<http://www.febsletters.org/article/S0014579313008144/fulltext>>. Acesso em: 18/9/2015.

LIM, A. G.; MAINI, P. K. HTLV-I infection: a dynamic struggle between viral persistence and host immunity. **Journal of theoretical biology**, v. 352, p. 92–108, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583256>>. Acesso em: 21/3/2015.

LIN, Z.; ZHAO, Q.; XING, L.; ZHOU, B.; WANG, X. Aggregating tags for column-free protein purification. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 12, p. 1877–1886, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26556016>>. Acesso em: 23/7/2019.

LOUREIRO, P. INFECÇÃO PELO HTLV-1: DIAGNÓSTICO E DETERMINAÇÃO DA CARGA PROVIRAL EM INDIVÍDUOS ASSINTOMÁTICOS E COM ENFERMIDADES ASSOCIADAS EM SERVIÇO DE REFERÊNCIA NO NORDESTE. **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**, v. Tese Douto, 2008. Disponível em: <<http://www.cpqam.fiocruz.br/bibpdf/2008loureiro-p.pdf>>. Acesso em: 26/10/2017.

MAKRIDES, S. C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 3, p. 512–38, 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239455&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18/9/2014.

MANNS, A.; MURPHY, E. L.; WILKS, R.; et al. Detection of early human T-cell lymphotropic virus type I antibody patterns during seroconversion among transfusion recipients. **Blood**, v. 77, n. 4, p. 896–905, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1993227>>. Acesso em: 17/7/2019.

MARANO, G.; VAGLIO, S.; PUPELLA, S.; et al. Human T-lymphotropic virus and transfusion safety: does one size fit all? **Transfusion**, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26388300>>. Acesso em: 2/11/2015.

MARIN, M. H.; RODRÍGUEZ-TANTY, C.; HIGGINSON-CLARKE, D.; BOCALANDRO,

Y. M.; PEÑA, L. P. Study of the peptide length and amino acid specific substitution in the antigenic activity of the chimeric synthetic peptides, containing the p19 core and gp46 envelope proteins of the HTLV-I virus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 3, p. 983–986, 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X05019364>>. Acesso em: 5/7/2019.

MARTIN, JESSICA L.; MENDONÇA, L. M.; ANGERT, I.; et al. Disparate Contributions of Human Retrovirus Capsid Subdomains to Gag- Gag Oligomerization, Virus Morphology, and Particle Biogenesis. **Journal of Virology**, v. 91, n. 14, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28446667>>. Acesso em: 12/7/2019.

MATSUOKA, M.; JEANG, K.-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270–280, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384582>>. Acesso em: 30/10/2017.

MATSUZAKI, T.; HASHIMOTO, K.; ARIMURA, K.; et al. Diseases Among Men Living in Human T-Lymphotropic Virus Type I Endemic Areas in Japan. **Internal Medicine**, v. 32, n. 8, p. 623–628, 1993.

MEISSNER, M. E.; MENDONÇA, L. M.; ZHANG, W.; MANSKY, L. M. Polymorphic Nature of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particle Cores as Revealed through Characterization of a Chronically Infected Cell Line. (S. R. Ross, Org.) **Journal of Virology**, v. 91, n. 16, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28615198>>. Acesso em: 23/7/2019.

MELLO, M. A. G.; DA CONCEIÇÃO, A. F.; SOUSA, S. M. B.; et al. HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence. **Virology journal**, v. 11, p. 28, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3974122&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/2/2015.

DE MENDOZA, C.; PIRÓN, M.; GONZALEZ, R.; et al. Clinical Presentation of Individuals With Human T-Cell Leukemia Virus Type-1 Infection in Spain. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p. ofz036, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30815504>>. Acesso em: 2/7/2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/Guia_de_manejo_clinico_do_paciente_com

_HTLV.pdf>. Acesso em: 11/3/2015.

MOSADEGHI, P.; ZARNAGH, H. H.; MOHAMMAD-ZADEH, M.; SALEHI MOGHADDAM, M. High-Level Soluble Expression and One-step Purification of HTLV-I P19 Protein in Escherichia coli by Fusion Expression. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, v. 14, n. 6, p. 624–32, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26725560>>. Acesso em: 11/7/2019.

MURPHY, E. L. Infection with human T-lymphotropic virus types-1 and -2 (HTLV-1 and -2): Implications for blood transfusion safety. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 23, n. 1, p. 13–19, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26778839>>. Acesso em: 27/10/2017.

MURPHY, E. L.; GLYNN, S. A.; FRIDEY, J.; et al. Increased incidence of infectious diseases during prospective follow-up of human T-lymphotropic virus type II- and I-infected blood donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 13, p. 1485–91, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399901>>. Acesso em: 10/9/2019.

NAKANO, K.; WATANABE, T.; NAKANO, K.; WATANABE, T. HTLV-1 Rex Tunes the Cellular Environment Favorable for Viral Replication. **Viruses**, v. 8, n. 3, p. 58, 2016. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/8/3/58>>. Acesso em: 5/8/2019.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 265–274, 2014. SBMT. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000300265&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25/2/2015.

PALOMARES, L. A.; ESTRADA-MONDACA, S.; RAMÍREZ, O. T.; et al. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. **Frontiers in Microbiology**, 2014.

PEREIRA, F. M.; ALMEIDA, M. DA C. C. DE; SANTOS, F. L. N.; et al. Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1002, 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31156570>>. Acesso em: 2/7/2019.

PHAN, J.; YAMOUT, N.; SCHMIDBERGER, J.; BOTTOMLEY, S. P.; BUCKLE, A. M. Refolding your protein with a little help from REFOLD. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 752, p. 45–57, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21713630>>. Acesso em: 21/11/2016.

POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W.; GAZDAR, A. F.; et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7415–9, 1980. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=350514&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/2/2015.

PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; CATALAN-SOARES, B. C.; MURPHY, E. L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058–68, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16155612>>. Acesso em: 10/3/2015.

PUCKETT, M. C. Hexahistidine (6xHis) Fusion-Based Assays for Protein-Protein Interactions. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1278, p.365–370, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859962>>. Acesso em: 23/7/2019.

QIU, X.; HODGES, S.; LUKASZEWSKA, T.; et al. Evaluation of a new, fully automated immunoassay for detection of HTLV-I and HTLV-II antibodies. **Journal of medical virology**, v. 80, n. 3, p. 484–93, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18205214>>. Acesso em: 8/11/2015.

RASULI, A. M.; RASULI SH, M.; KLEPIKOV, N. N.; et al. [Cross reactivity and amino acid structural homology of immunodominant peptide fragments of structural viruses from the human retroviruses HTLV-I, HTLV-II, HIV-1, and HIV-2]. **Mol Biol (Mosk)**, 1995.

RAYNE, F.; BOUAMR, F.; LALANNE, J.; MAMOUN, R. Z. The NH2-Terminal Domain of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Capsid Protein Is Involved in Particle Formation. **Journal of Virology**, 2002.

REN, J.; WEN, L.; GAO, X.; et al. DOG 1.0: illustrator of protein domain structures. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 271–273, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19153597>>. Acesso em: 2/8/2019.

RIBEIRO, I. P.; KOZLOWSKI, A. G.; DIAS DE MATOS, M. A.; et al. HTLV-1 and -2 in a first-time blood donor population in Northeastern Brazil: Prevalence, molecular characterization, and evidence of intrafamilial transmission. **Journal of Medical Virology**, v. 90, n. 10, p. 1651–1657, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29797609>>. Acesso em: 2/7/2019.

RIBEIRO, M. A.; MARTINS, M. L.; TEIXEIRA, C.; et al. Blocking vertical transmission

of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 through breastfeeding interruption. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 31, n. 11, p. 1139–43, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683674>>. Acesso em: 2/11/2015.

ROMANELLI, M. G.; DIANI, E.; BERGAMO, E.; et al. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 271, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3766827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/3/2015.

ROSANO, GERMÁN L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2014.00172/abstract>>. Acesso em: 11/7/2019.

SANTOS, F. L. N. Caracterização do potencial diagnóstico de poliantígenos para detecção do Trypanosoma cruzi na fase crônica da doença de Chagas. **FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES**, 2016. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

SANTOS, R. F. DE S. PREVALÊNCIA DO VÍRUS LINFOTRÓFICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1) NOS PACIENTES EM HEMODIÁLISE DE MANUTENÇÃO EM SALVADOR. Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/12993/1/Dissertação_ICS_Rilma_Ferreira_de_Souza_Santos.pdf>. Acesso em: 11/3/2015.

SAÚDE, M. DA. **Guia de manejo clínico da infecção pelo HTLV**. 2013.

SAÚDE, M. DA. **RCD 158/2016**. 2016.

SEIKI, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 12, p. 3618–22, 1983. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=394101&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25/2/2015.

SHARP, P. M.; LI, W. H. The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. **Nucleic acids research**, v. 15, n. 3, p. 1281–95, 1987. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=340524&tool=pmcentrez&>

rendertype=abstract>. Acesso em: 27/9/2014.

DA SILVA BRITO, V.; SANTOS, F. L. N.; GONÇALVES, N. L. S.; et al. Performance of Commercially Available Serological Screening Tests for Human T-Cell Lymphotropic Virus Infection in Brazil. (Y.-W. Tang, Org.) **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 12, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30232131>>. Acesso em: 2/7/2019.

SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–28, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607230>>. Acesso em: 10/7/2014.

SOUZA, C. DE, 1978-. Desenvolvimento de antígenos e anticorpos recombinantes com potencial ao diagnóstico do vírus sincicial respiratório humano. , 2017. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/57613>>. Acesso em: 20/9/2019.

SUNDARAM, R.; BEEBE, M.; KAUMAYA, P. T. P. Structural and immunogenicity analysis of chimeric B-cell epitope constructs derived from the gp46 and gp21 subunits of the envelope glycoproteins of HTLV-1. **Journal of Peptide Research**, 2004.

SUZUKI, Y.; GOJOBORI, T. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus types I and II. **Virus genes**, v. 16, n. 1, p. 69–84, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9562892>>. Acesso em: 9/3/2015.

TAGAYA, Y.; GALLO, R. C. The Exceptional Oncogenicity of HTLV-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1425, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28824561>>. Acesso em: 30/1/2019.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725–9, 2013. Oxford University Press. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132122>>. Acesso em: 30/10/2017.

TERPE, K. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 5, p. 523–533, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12536251>>. Acesso em: 23/7/2019.

THORSTENSSON, R.; ALBERT, J.; ANDERSSON, S. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. **Transfusion**, v. 42, n. 6, p. 780–91, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147033>>. Acesso em: 3/7/2019.

TOSSWILL, J. H. C.; TAYLOR, G. P. Interpretation of low reactivity in the Abbott

Architect rHTLV I/II assay. **Transfusion Medicine**, v. 28, n. 4, p. 326–330, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29067784>>. Acesso em: 23/7/2019.

TSUKASAKI, K.; TOBINAI, K. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia-lymphoma: new directions in clinical research. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 20, n. 20, p. 5217–25, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25320371>>. Acesso em: 22/3/2015.

TSUMOTO, K.; EJIMA, D.; KUMAGAI, I.; ARAKAWA, T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. **Protein expression and purification**, v. 28, n. 1, p. 1–8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12651100>>. Acesso em: 21/11/2016.

VASINA, J. A.; BANEYX, F. Expression of aggregation-prone recombinant proteins at low temperatures: a comparative study of the Escherichia coli cspA and tac promoter systems. **Protein expression and purification**, v. 9, n. 2, p. 211–8, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9056486>>. Acesso em: 2/11/2015.

VEDHAM, V.; VERMA, M. Cancer-associated infectious agents and epigenetic regulation. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1238, p. 333–54, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25421669>>. Acesso em: 25/2/2015.

VEDHAM, V.; VERMA, M.; MAHABIR, S. Early-life exposures to infectious agents and later cancer development. **Cancer medicine**, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26377256>>. Acesso em: 8/10/2015.

VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; VAN DOOREN, S.; et al. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 7, n. 4, p. 266–81, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376384>>. Acesso em: 9/3/2015.

VIANA, G. M. DE C.; NASCIMENTO, M. DO D. S. B.; DE OLIVEIRA, R. A. S.; et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 36, n. 1, p. 50–3, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3948666&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/3/2015.

VIANA, G. M. DE C.; DA SILVA, M. A. C. N.; SOUZA, V. L.; LOPES, N. B. DA S.;

NASCIMENTO, M. DO D. S. B. Endemic transmission of HTLV-2 in blood donors from São Luís do Maranhão, northeastern Brazil: report of two asymptomatic individuals. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 37, n. 2, p. 130–1, 2015.

Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4382574&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 2/11/2015.

VRAY, M. **EVALUATION DES TESTS DE DIAGNOSTIC Plan de la présentation**. Paris, 2015.

VRIELINK, H.; REESINK, H.; HABIBUW, M.; et al. Comparison of four HTLV-I and HTLV-I + II ELISAs. **Vox sanguinis**, v. 76, n. 3, p. 187–91, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10341336>. Acesso em: 8/11/2015.

VRIELINK, H.; REESINK, H. W. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations. **Transfusion medicine reviews**, v. 18, n. 1, p. 46–57, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689377>. Acesso em: 22/3/2015.

WADA, K.; WADA, Y.; ISHIBASHI, F.; GOJOBORI, T.; IKEMURA, T. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. **Nucleic acids research**, v. 20 Suppl, p. 2111–8, 1992. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=333987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 27/9/2014.

WILLEMS, L.; HASEGAWA, H.; ACCOLLA, R.; et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. **Antiviral research**, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27840202>. Acesso em: 15/11/2016.

YOSHIDA, M.; SEIKI, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 8, p. 2534–7, 1984. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=345097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 25/2/2015.

ZARNAGH, H. H.; RAVANSHAD, M.; POURFATOLLAH, A. A.; RASAEI, M. J. Expression and Purification of a Novel Computationally Designed Antigen for Simultaneously Detection of HTLV-1 and HBV Antibodies. **Iranian Journal of Allergy, Asthma and Immunology**, 2015. Disponível em: <http://ijaai.tums.ac.ir/index.php/ijaai/article/view/397>. Acesso em: 4/11/2015.